

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/095612 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, A61K 45/00, A61P 1/00, 35/00, C07K 14/705, 16/28, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005918

(22) 国際出願日: 2005 年3 月29 日 (29.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-106268 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1038234 東京都中央区日本橋三丁目1 4 番1 0 号 Tokyo (JP). 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小原 収 (OHARA, Osamu) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2 丁目6 番7 号 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内 Chiba (JP). 長瀬 隆弘 (NAGASE, Takahiro) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2 丁目6 番7 号 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内 Chiba (JP). 大石 道夫 (OISHI, Michio) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2 丁目6 番7 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内 Chiba (JP). 横田 博 (YOKOTA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1348630 東京都江戸川区北葛西一丁目1 6 番1 3 号 第一製薬株

式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP). 上田 修 (KAMIDA, Osamu) [JP/JP]; 〒1348630 東京都江戸川区北葛西一丁目1 6 番1 3 号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒1010032 東京都千代田区岩本町3 丁目2 番1 0 号 SN 岩本町ビル6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE ENCODING GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR AND GENE PRODUCT THEREOF

(54) 発明の名称: グアニンヌクレオチド交換因子をコードする遺伝子およびその遺伝子産物

(57) Abstract: It is intended to provide a gene encoding a novel protein acting as a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rho family proteins (a group of low-molecular weight GTP-binding proteins), namely, a polynucleotide represented by a base sequence shown by SEQ ID NO:1, 3 or 5 or its complementary strand; a homolog of this polynucleotide; a protein encoded by the above-described polynucleotide; a vector containing the above-described polynucleotide; a transformant containing the above-described vector; an antigen against the protein encoded by the above-described polynucleotide; a method of identifying a compound inhibiting the function and/or expression of the protein encoded by the above-described polynucleotide; a method of diagnosing a disease; a medicinal composition; and a reagent kit.

(57) 要約: 低分子量GTP結合蛋白質の1グループであるRhoファミリー蛋白質に対してグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として作用する新規な蛋白質をコードする遺伝子、すなわち配列番号1、3または5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドの相同物、前記ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、前記ベクターを含む形質転換体、前記ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質に対する抗体、前記ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質の機能および/または発現を阻害する化合物の同定方法、疾患の判定方法、医薬組成物および試薬キットを提供した。



WO 2005/095612 A1

明 細 書

グアニンヌクレオチド交換因子をコードする遺伝子およびその遺伝子産物 技術分野

[0001] 本発明は、低分子量GTP結合蛋白質の1グループであるRhoファミリー蛋白質に対してグアニンヌクレオチド交換因子として作用する蛋白質および該蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。より詳しくは、Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質であるCdc42と結合する蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体に関する。また、前記蛋白質の製造方法、前記蛋白質に対する抗体に関する。さらに、前記蛋白質の機能および／または前記ポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法に関する。また、前記ポリヌクレオチドの発現量を測定することを特徴とする胃腫瘍の診断方法に関する。さらに、前記蛋白質の機能阻害剤および／または前記ポリヌクレオチドの発現阻害剤を有効成分として含んでなる胃腫瘍の防止剤および／または治療剤、前記蛋白質の機能阻害剤および／または前記ポリヌクレオチドの発現阻害剤を用いることを特徴とする、胃腫瘍の防止方法および／または治療方法に関する。また、前記蛋白質、前記ポリヌクレオチド、前記組換えベクター、前記形質転換体および前記抗体のうち、少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キットに関する。

背景技術

[0002] Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質(以下、単にRhoファミリー蛋白質と称することがある)は低分子量GTP結合蛋白質(以下、単に低分子量G蛋白質と称する)の1グループに属する蛋白質である。低分子量G蛋白質は、細胞膜受容体と細胞内情報伝達経路に關与する効果器(エフェクター)との間で、シグナルの増幅因子として作用する。また、低分子量G蛋白質は、グアノシン5'-三リン酸(GTP)またはグアノシン5'-二リン酸(GDP)と特異的に結合し、結合したGTPをGDPに加水分解する酵素活性をもつ。細胞膜受容体に細胞外情報物質が結合すると、そのシグナルが低分子量G蛋白質に伝達され、低分子量G蛋白質に結合しているGDPと細胞内に存

在するGTPとの交換反応(以下、GDP／GTP交換反応と略称する)が起きる。その結果、活性型(GTP結合型)低分子量G蛋白質が生じる。活性型低分子量G蛋白質は、エフェクターに作用してシグナルを増幅する。その後、活性型低分子量G蛋白質は、その酵素活性により、結合しているGTPをGDPに加水分解し、それにより不活性化する。このように、低分子量G蛋白質は、グアニンヌクレオチドの交換により、細胞内情報伝達経路において分子スイッチとして働く。

- [0003] Rhoファミリー蛋白質として、Cdc42、Rac1およびRhoA等が知られている。Cdc42は線維芽細胞でフィロポディアの形成を制御している。Rac1は、白血球やマクロファージではスーパーオキシドの産生を、線維芽細胞では細胞膜のラフリングやラメリポディアの形成を制御している。また、Cdc42とRac1はc-Jun N末端キナーゼシグナル伝達経路を活性化し得る。このように、Rhoファミリー蛋白質は、細胞内情報伝達の制御を介して様々な細胞機能に関与している。Rhoファミリー蛋白質が関与する細胞機能として、例えば細胞骨格の再構成、細胞接着、遺伝子発現等が知られている。Rhoファミリー蛋白質を介するこのような作用は、発生時の形態形成、白血球等の遊走、神経突起退縮、および癌細胞の転移や浸潤に働くと考えられる。
- [0004] Rhoファミリー蛋白質の分子スイッチとしての作用に関与している分子の1つがRhoグアニンヌクレオチド交換因子(Rho Guanine nucleotide Exchange Factor、以下Rho-GEFと略称する)である。Rho-GEFは、Rhoファミリー蛋白質のGDP／GTP交換反応を促進してRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する。この機能により、Rho-GEFは、Rhoファミリー蛋白質が関与する細胞内情報伝達の制御に重要な役割を担う。以下、GDP／GTP交換反応を促進する機能をGEF活性と称することがある。
- [0005] Rho-GEFには、特徴的ドメイン構造、例えばDbl相同ドメイン(Dbl Homology Domain、以下DHドメインと略称する)およびプレックストリン相同ドメイン(Pleckstrin Homology Domain、以下PHドメインと略称する)が存在する。DH／PHのタンデム構造は、Rho-GEFに典型的なドメイン構造である。以下、DHドメインおよびPHドメインのタンデム構造を、DH／PHドメインと呼称する。
- [0006] DH／PHドメインは、Rho-GEFによるRhoファミリー蛋白質の活性化に寄与する

重要なドメインであり、Rho-GEFの活性ドメインであると考えられている。例えば、Rho-GEFのプロトタイプであるproto-Dblのアミノ酸配列のうち、DH/PHドメインを含むC末端側領域からなる蛋白質が、Rhoファミリー蛋白質を活性化することが報告されている(非特許文献1)。この報告において、proto-Dblの全長925アミノ酸残基からなるアミノ酸配列のうちN末端側第1番目から第497番目のアミノ酸残基の欠失により生じたC末端側領域からなる蛋白質は、Rhoファミリー蛋白質を活性化し、その結果、細胞形質転換に関与した。このことから、proto-Dblの活性化は腫瘍原性活性化(oncogenic activation)と考えられている。以下、proto-DblのC末端側領域からなるこのような蛋白質をoncogenic-Dblと呼称する。oncogenic-Dblが、RhoA、Cdc42およびRac1と結合すること、並びにCdc42およびRhoAに対してGEF活性を有する一方、Rac1にはGEF活性を示さないことが報告されている(非特許文献2)。

[0007] proto-Dblのファミリー蛋白質をコードする遺伝子として、例えばvav(非特許文献3および4)、ost(非特許文献5)、lbc(非特許文献6)等が知られている。これら遺伝子は癌に関与する遺伝子である。その他、Rho-GEFとして作用する蛋白質をコードする遺伝子として、Trio(非特許文献7)やkalirin(非特許文献8)等が報告されている。Trioは、そのノックアウトマウスにおいて胎仔発生時の骨格筋の異常および脳の構成異常を引き起こす。kalirinは、神経細胞における神経突起形成に関与する。このように、Rho-GEFとして作用する蛋白質が関与する細胞機能は各蛋白質ごとに固有であり、また、該蛋白質が活性化するRhoファミリー蛋白質もそれぞれ異なる。

[0008] 以下に本明細書において引用した文献を列記する。

非特許文献1:ビ(Bi, F.)ら、「モレキュラー アンド セルラー バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)」、2001年、第21巻、p. 1463-1474。

非特許文献2:ハート(Hart, M. J.)ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)」、1994年、第269巻、p. 62-65。

非特許文献3:カツァブ(Katzav, S.)ら、「エンボ ジャーナル(EMBO Journal)」、1989年、第8巻、p. 2283-2290。

非特許文献4:コステロ(Costello, P. S.)ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショ

ナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1999年、第96巻、p. 3035–3040。

非特許文献5:ホリイ(Horii, Y.)ら「エンボ ジャーナル(EMBO Journal)」、1994年、第13巻、p. 4776–4786。

非特許文献6:トクソズ(Toksoz, D.)ら、「オンコジーン(Oncogene)」、1994年、第9巻、p. 621–628。

非特許文献7:オブリエン(O'Brien, S. P.)ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2000年、第97巻、p. 12074–12078。

非特許文献8:ペンゼス(Penzes, P.)ら、「ジャーナル オブ ニューロサイエンス(Journal of Neuroscience)」、2001年、第21巻、p. 8426–8434。

非特許文献9:サムブルック(Sambrook)ら編、「モレキュラークローニング, ア ラボラトリーマニュアル 第2版」、1989年、コールドスプリングハーバーラボラトリー。

非特許文献10:村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社。

非特許文献11:マディン(Madin, K.)ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2000年、第97巻、p. 559–564。

非特許文献12:ウルマー(Ulmer, K. M.)、「サイエンス(Science)」、1983年、第219巻、p. 666–671。

非特許文献13:エールリッヒ(Ehrlich, H. A.)編、「PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用」、1989年、ストックトンプレス。

非特許文献14:サイキ(Saiki, R. K.)ら、「サイエンス(Science)」、1985年、第230巻、p. 1350–1354。

非特許文献15:「実験医学」、1994年、第12巻、第6号、p. 35–。

非特許文献16:フローマン(Frohman, M. A.)ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1988年、第85巻、第23号、p. 8998-9002。

非特許文献17:サンガー(Sanger, F.)ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1977年、第74巻、p. 5463-5467。

非特許文献18:マキシム(Maxam A. M.)ら、「メソッズ イン エンザイモロジー(Methods in Enzymology)」、1980年、第65巻、p. 499-560。

非特許文献19:オハラ(Ohara, O.)ら、「ディーエヌエー リサーチ(DNA Research)」、1997年、第4巻、p. 53-59。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明の課題は、新規なRho-GEFおよび該Rho-GEFをコードする遺伝子を提供することである。また本発明の課題には、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体を提供することも含まれる。さらに本発明の課題には、該Rho-GEFの製造方法および該Rho-GEFを認識する抗体を提供することも含まれる。また本発明の課題には、該Rho-GEFの機能および／または該遺伝子の発現を阻害する化合物の同定方法を提供することも含まれる。さらに本発明の課題には、該Rho-GEFの機能の異常および／または該遺伝子の発現の異常に基づく疾患の防止方法および／または治療方法、並びに該疾患の診断方法、試薬キットを提供することも含まれる。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは上記課題解決のために鋭意努力し、新規Rho-GEFをコードする遺伝子を見出し、該遺伝子を用いて新規Rho-GEFを取得することに成功した。そして、該Rho-GEFのDH/PHドメインを含む部分蛋白質が、Rhoファミリー蛋白質

であるRhoA、Cdc42およびRac1とそれぞれ結合することを実験的に明らかにした。また、該蛋白質がCdc42の活性化を促進することを実証した。さらに該Rho-GEF遺伝子の組織発現が、ある胃腺癌様腫瘍(Adenocarcinoid tumor)例において正常な胃組織の約5倍、4.5倍以上であることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて達成した。

- [0011] すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドに関する。
- [0012] また本発明は、配列表の配列番号3若しくは5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号4若しくは6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドに関する。
- [0013] さらに本発明は、配列表の配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。
- [0014] さらにまた本発明は、前記ポリヌクレオチドの塩基配列と少なくとも約70%の相同性を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。
- [0015] また本発明は、前記ポリヌクレオチドの塩基配列において、1乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。
- [0016] さらに本発明は、前記ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。

- [0017] さらにまた本発明は、前記いずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクターに関する。
- [0018] また本発明は、前記組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体に関する。
- [0019] さらに本発明は、前記組換えベクターおよびCdc42をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体に関する。
- [0020] さらにまた本発明は、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質に関する。
- [0021] また本発明は、配列表の配列番号4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質に関する。
- [0022] さらに本発明は、前記いずれかのポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質に関する。
- [0023] さらにまた本発明は、前記形質転換体を培養する工程を含む、前記いずれかの蛋白質の製造方法に関する。
- [0024] また本発明は、前記いずれかの蛋白質を認識する抗体に関する。
- [0025] さらに本発明は、前記いずれかの蛋白質の機能および／または前記いずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と該蛋白質および／または該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該機能および／または該発現の存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該蛋白質の機能および／または該ポリヌクレオチドの発現を阻害するか否かを判定することを特徴とする同定方法に関する。
- [0026] さらにまた本発明は、蛋白質の機能が、Cdc42と結合する機能および／またはCdc42の活性化を促進する機能である前記同定方法に関する。
- [0027] また本発明は、前記いずれかの蛋白質の機能および／または前記いずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、前記いずれかの蛋白質、前記いずれかのポリヌクレオチド、前記組換えベクター、前記形質転換体および前記抗体のうち少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする同定方法に関する。
- [0028] さらに本発明は、蛋白質の機能が、Cdc42と結合する機能および／またはCdc42

の活性化を促進する機能である前記同定方法に関する。

[0029] さらにまた本発明は、ヒト胃組織由来の被検組織が、ヒト胃腫瘍由来組織であるか否かを判定する方法であって、該被検組織における前記いずれかのポリヌクレオチドの発現量を測定することを特徴とする判定方法に関する。

[0030] また本発明は、被検組織における前記いずれかのポリヌクレオチドの発現量が、対照であるヒト正常胃由来組織における該ポリヌクレオチドの発現量の4.5倍以上である場合に、被検組織がヒト胃腫瘍由来組織であると判定することを特徴とする、前記判定方法に関する。

[0031] さらに本発明は、前記いずれかの蛋白質の機能を阻害する化合物および／または前記いずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を有効成分として含んでなる胃腫瘍の防止剤および／または治療剤に関する。

[0032] さらにまた本発明は、前記いずれかの蛋白質の機能を阻害する化合物および／または前記いずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を用いることを特徴とする胃腫瘍の防止方法および／または治療方法に関する。

[0033] また本発明は、前記いずれかの蛋白質、前記いずれかのポリヌクレオチド、前記組換えベクター、前記形質転換体および前記抗体のうち少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キットに関する。

発明の効果

[0034] 本発明においては、Rhoファミリー蛋白質に結合する機能を有し、GDP/GTP交換反応を促進してRhoファミリー蛋白質を活性化し得る新規蛋白質および該蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供できる。本蛋白質は、Rhoファミリー蛋白質であるRhoA、Cdc42およびRac1とそれぞれ結合する。さらに本蛋白質は、Cdc42の活性化を促進する。本蛋白質およびポリヌクレオチドにより、Rhoファミリー蛋白質が関与する情報伝達経路および細胞機能の解明とその調節が実施できる。さらに、本蛋白質の機能の異常および／または本ポリヌクレオチド発現の異常に基づく疾患、例えば胃腫瘍の診断、防止および／または治療が実施できる。

図面の簡単な説明

[0035] [図1]cDNAクローンhj03796または該cDNAの部分配列からなるDNAであってD

H/PHドメインコード領域を含むDNAを用いて構築したベクターを導入した細胞の細胞溶解液において、hj03796がコードする蛋白質または該蛋白質のDH/PHドメインを含む蛋白質断片(hj03796DH/PH)を示すバンドが、ウエスタンブロッティング法により検出されたこと(それぞれレーン1および4)を説明する図である。proto-Dbl DH/PHは陽性コントロールとして用いた(レーン2および5)。ベクターを導入しなかったコントロール細胞から同様の処理により得た蛋白質溶液では、かかるバンドは検出されなかった(レーン3および6)。(実施例2)

[0036] [図2]cDNAクローンhj03796の部分配列からなるDNAであってDH/PHドメインコード領域を含むDNAと、Rac1遺伝子(レーン1)、RhoA遺伝子(レーン2)またはCdc42遺伝子(レーン3)とを共発現させた細胞の細胞溶解液において、該DNAがコードする蛋白質(hj03796DH/PH)とRac1(レーン1)、RhoA(レーン2)およびCdc42(レーン3)との結合を示すバンドが検出されたことを説明する図である(上図)。結合の測定はプルダウン法により行った。陰性コントロールとしてRhoファミリー蛋白質の代わりにGST-tag融合 β -グルクロニダーゼを用いたとき、あるいはRhoファミリー蛋白質遺伝子を発現させなかったときにはかかるバンドは認められなかった(それぞれレーン4および5)。proto-Dbl DH/PHは陽性コントロールとして用いた。各細胞溶解液において、hj03796DH/PHまたはproto-Dbl DH/PHの発現量はほぼ同等であった(下図)。(実施例3)

[0037] [図3-A]hj03796DH/PHとRhoファミリー蛋白質を共発現させた細胞、およびhj03796DH/PHまたはRhoファミリー蛋白質を発現させた細胞のいずれにおいても、hj03796DHまたはRhoファミリー蛋白質の発現がほぼ同等であったことを示す図である。図中GEFとはhj03796DH/PHを意味し、RhoとはRhoファミリー蛋白質を意味する。また、黒矢頭はhj03796DH/PHを、白矢頭はRhoファミリー蛋白質を示す。(実施例4)

[0038] [図3-B]hj03796DH/PHとCdc42を共発現させた細胞で、Cdc42のみを発現させた細胞と比較して、PAK-1に結合する活性型Cdc42が増加したことを示す図である(レーン4)。図中GEFとはhj03796DH/PHを意味し、RhoとはRhoファミリー蛋白質を意味する。また、白矢頭はRhoファミリー蛋白質を示す。(実施例4)

発明を実施するための最良の形態

[0039] 以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本明細書においては、単離された完全長DNAおよび／またはRNA；合成完全長DNAおよび／またはRNA；単離されたDNAオリゴヌクレオチド類および／またはRNAオリゴヌクレオチド類；あるいは合成DNAオリゴヌクレオチド類および／またはRNAオリゴヌクレオチド類を意味する総称的用語として「ポリヌクレオチド」という用語を使用し、ここでそのようなDNAおよび／またはRNAは最小サイズが2ヌクレオチドである。

[0040] 本明細書においては、単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「蛋白質」という用語を使用し、ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドは最小サイズが2アミノ酸である。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

[0041] (ポリヌクレオチド)

本発明の一態様は新規ポリヌクレオチドに関する。本ポリヌクレオチドは、ヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーから、Rho-GEFに特徴的なドメインであるDH/PHドメインをコードする領域を有する遺伝子として同定した。ヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーは、市販のヒト脳、胎児脳および脳海馬由来のpolyA⁺RNAを出発原料として常法により構築したcDNAライブラリーについてdbEST(database of Expressed Sequence Tags)分析によりcDNA断片を単離して全塩基配列を決定したcDNAクローンからなるcDNAライブラリーである。

[0042] 本発明に係るポリヌクレオチドの具体的態様は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであり得る。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、4977bpのポリヌクレオチドであり、1340アミノ酸残基(配列番号2)をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。配列番号1に記載の塩基配列において第602番目から第1126番目までのヌクレオチドからなる領域は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第97番目のバリン(Val)から第271番目のアスパラギン酸(Asp)までの175アミノ酸残基からなる

DHドメインをコードする。配列番号1に記載の塩基配列において第1202番目から第1495番目までのヌクレオチドからなる領域は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第297番目のロイシン(Leu)から第394番目のロイシン(Leu)までの98アミノ酸残基からなるPHDドメインをコードする。配列番号1に記載の塩基配列において第602番目から第1495番目までのヌクレオチドからなる領域は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第97番目のバリン(Val)から第394番目のロイシン(Leu)までの298アミノ酸残基からなるDH/PHDドメインをコードする。本発明の範囲には、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも包含される。

[0043] 本発明に係るポリヌクレオチドとしてまた、配列番号3若しくは5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが例示できる。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、配列番号1に記載の塩基配列の第581番目から第1675番目までの塩基配列で表わされるポリヌクレオチドである。また、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの5'末端にコザックコンセンサス配列(以下、コザックシーケンスと略称する)とメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)が付加されたポリヌクレオチドである。配列番号3または5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、Rho-GEFの活性ドメインであるDH/PHDドメインをコードする領域を含む。

[0044] 本発明に係るポリヌクレオチドは、好ましくは、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドである。かかるポリヌクレオチドとして、配列番号5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを好ましく例示できる。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドとRhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子とを共に発現させた動物細胞において、Rhoファミリー蛋白質の活性化が促進された(実施例4参照)。すなわち、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進すると考える。配列番号5に記載の塩基配列で表わさ

れるポリヌクレオチドは、配列番号1に記載の塩基配列の第581番目から第1675番目までの塩基配列で表わされるポリヌクレオチド(配列番号3)の5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)が付加されたポリヌクレオチド(配列番号5)である。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質のN末端にメチオニンがペプチド結合により付加された蛋白質である。コザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの発現を目的として付加したオリゴヌクレオチドであり、発現された蛋白質の機能に大きな影響を与えない。したがって、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、コザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)が付加されていないが、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。

[0045] 配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質および配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質はいずれも、上記のように、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質として配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質が挙げられる。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質として配列番号6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質が挙げられる。配列番号4若しくは6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも本発明の範囲に包含される。

[0046] 配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考えられることから、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドも、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。また、配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオ

チドも、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドとして例えば、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。

[0047] 本発明の範囲には、配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドまたは配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドも包含される。好ましくは、このようなポリヌクレオチドであって、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドである。さらに好ましくは、該ポリヌクレオチドであって、DH/PHドメインコード領域を有するポリヌクレオチドである。

[0048] 本発明に係るポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質によって活性化が促進されるRhoファミリー蛋白質として、例えばCdc42、RhoAおよびRac1等、より好ましくはCdc42が例示できる。Rhoファミリー蛋白質はこれらに限定されず、本ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質によって活性化が促進される限りにおいていずれのRhoファミリー蛋白質であってもよい。本ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質の、Rhoファミリー蛋白質の活性化に対する促進機能は、例えばエフェクタープルダウン法を使用して測定できる(実施例4参照)。

[0049] Cdc42、RhoAおよびRac1は、それぞれ配列表の配列番号21、23および25に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質である。Cdc42遺伝子、RhoA遺伝子およびRac1遺伝子は、それぞれ配列表の配列番号20、22および24に記載の塩基配列で表わされる遺伝子である。Cdc42、RhoAおよびRac1並びにこれらの遺伝子は、上記各配列で表わされるものに限らず、一般的に知られているCdc42、RhoAおよびRac1の機能を有する限りにおいて、上記各配列において1乃至数個の変異を有する蛋白質および遺伝子であることができる。また、これらの機能を促進するあるいは欠失させるといった所望の目的のために上記各配列に1乃至数個の変異を導入した変異体を用いることもできる。Cdc42、RhoAおよびRac1の製造は、例えばその遺伝

子を含む組換えベクターを自体公知の遺伝子工学的方法により導入してなる形質転換体を培養すること等により実施できる。

[0050] 本発明に係るポリヌクレオチドの取得は、本発明により開示されたその具体例、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドについての配列情報に基づいて、公知の遺伝子工学的手法(非特許文献9および10等を参照)により容易に実施できる。

[0051] 具体的には、本発明に係るポリヌクレオチドの発現が確認されている適当な起源から、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該cDNAライブラリーから所望のクローンを選択することにより本ポリヌクレオチドを取得できる。cDNAの起源として、本ポリヌクレオチドの発現が確認されている各種の細胞や組織、またはこれらに由来する培養細胞、例えばヒトの脳由来の細胞等が例示できる。これら起源からの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従って実施できる。また、ヒトの脳、胎児脳および脳海馬由来の市販されているpoly A⁺ RNAからcDNAライブラリーを構築して用いることもできる。cDNAライブラリーから所望のクローンを選択する方法も特に制限されず、慣用の方法を利用できる。例えば、本ポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイゼーションするプローブやプライマー等を用いて所望のクローンを選択できる。具体的には、本ポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイゼーションするプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法等やこれらを組合せた方法等を例示できる。ここで用いるプローブとして、本ポリヌクレオチドの配列情報に基づいて化学合成したポリヌクレオチド等が一般的に使用できる。また、既に取得された本ポリヌクレオチドやその部分塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも好ましく使用できる。さらに、本ポリヌクレオチドの配列情報に基づき設計したセンスプライマー、アンチセンスプライマーをかけるプローブとして用いることもできる。

[0052] cDNAライブラリーからの所望のクローンの選択は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して各クローンについて発現蛋白質の確認を行い、さらに該蛋白質の機能を指標にして実施できる。本ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質の機能として、例えば、RhoA、Cdc42およびRac1等のRhoファミリー蛋白質と結合する機能およびRh

oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能が挙げられる。蛋白質発現系として、自体公知の発現系がいずれも利用できるが、無細胞蛋白質発現系の利用が簡便である(非特許文献11)。

- [0053] ここで、「Rhoファミリー蛋白質の活性化」とは、Rhoファミリー蛋白質に結合したグアノシン5′-二リン酸(GDP)をグアノシン5′-三リン酸(GTP)に交換する反応を意味する。本反応は、Rhoファミリー蛋白質からのGDPの解離反応と、その結果生成したヌクレオチドに結合していないRhoファミリー蛋白質へのGTPの結合反応からなる。「Rhoファミリー蛋白質の活性化の促進」とは、本反応の律速段階であるRhoファミリー蛋白質からのGDPの解離反応を促進することを意味する。
- [0054] 本発明に係るポリヌクレオチドの取得にはその他、ポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCRと略称する、非特許文献12-14)によるDNA/RNA増幅法が好適に利用できる。cDNAライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法(非特許文献15)、特に5′-RACE法(非特許文献16)等の採用が好適である。PCRに使用するプライマーは、ポリヌクレオチドの塩基配列情報に基づいて適宜設計でき、常法に従って合成により取得できる。増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、常法、例えばゲル電気泳動法等により実施できる。
- [0055] かくして得られるポリヌクレオチドの塩基配列の決定は、常法、例えばジデオキシ法(非特許文献17)やマキシサム-ギルバート法(非特許文献18)等により、また簡便には市販のシーケンスキット等を用いて実施できる。
- [0056] 本発明に係るポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドに限定されず、上記ポリヌクレオチドと配列相同性を有し、かつRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを包含する。配列相同性は、通常、塩基配列の全体で約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上であることが適当である。さらにより好ましくは、DH/PHドメインコード領域を有するポリヌクレオチドが望ましい。DH/PHドメインコード領域における配列相同性は約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上であることが適当である。またDH/PHドメインがその機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進す

る機能を保持していることがさらに好ましい。

[0057] 本発明に係るポリヌクレオチドには、上記ポリヌクレオチドの塩基配列において1個以上、例えば1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1個乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加または挿入といった変異が存する塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが包含される。変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有するポリヌクレオチドがRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質、より好ましくはDH／PHドメインを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドである限り特に制限されない。変異を有するポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドであってよく、誘発変異を有するポリヌクレオチドであってよい。また、天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たポリヌクレオチドであってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはPCR等を、単独でまたは適宜組合せて用いることができる。例えば成書に記載の方法(非特許文献9および10)に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、ウルマーの技術(非特許文献12)を利用することもできる。

[0058] 本発明に係るポリヌクレオチドとしてはまた、上記ポリヌクレオチドにストリンジেন্টな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを例示できる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば成書に記載の方法(非特許文献9)等に従うことができる。具体的には、「ストリンジেন্টな条件下」とは、例えば、6×SSC、0.5% SDSおよび50% ホルムアミドの溶液中で42℃にて加温した後、0.1×SSC、0.5% SDSの溶液中で68℃にて洗浄する条件をいう。これらポリヌクレオチドは本ポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであれば相補的配列を有するポリヌクレオチドでなくてもよい。好ましくは、コードする蛋白質がRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質であり、より好ましくはDH／PHドメインを有する蛋白質であることが望ましい。

[0059] 本発明に係るポリヌクレオチドには、上記ポリヌクレオチドの指定された領域に存在する部分塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドが包含される。このようなオリゴヌク

レオチドは、その最小単位として好ましくは該領域において連続する5個以上のヌクレオチド、より好ましくは10個以上、より好ましくは20個以上のヌクレオチドからなる。これらオリゴヌクレオチドは、本発明に係るポリヌクレオチドの塩基配列情報に従って、所望の配列を設計し、自体公知の化学合成法により製造できる。簡便には、DNA/RNA自動合成装置を用いてオリゴヌクレオチドを製造できる。これらオリゴヌクレオチドは、本遺伝子または本遺伝子断片を増幅するためのプライマー、本遺伝子またはその転写産物を検出するためのプローブ等として用いることができる。

[0060] 本発明に係るポリヌクレオチドの指定された領域に存在する部分塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドとして、配列表の配列番号7、8、9または10に記載の塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドを好ましく例示できる。

[0061] 本発明に係るポリヌクレオチドはヒト由来のポリヌクレオチドであるが、本ポリヌクレオチドと配列相同性を有し、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、好ましくはDH/PHドメインコード領域を有するポリヌクレオチドである限りにおいて、哺乳動物由来のポリヌクレオチド、例えばマウス、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラットまたはウサギ等由来のポリヌクレオチドも本発明に包含される。

[0062] 本発明に係るポリヌクレオチドは、その発現あるいはそれがコードする蛋白質の機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能が阻害されない限りにおいて、5'末端側や3'末端側に所望の遺伝子が付加されたポリヌクレオチドであってよい。本ポリヌクレオチドに付加することのできる遺伝子は、具体的には例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (HRP) またはアルカリホスファターゼ (ALP) 等の酵素類、あるいはHis-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類等の遺伝子を例示できる。これら遺伝子から選択した1種類または複数種類の遺伝子を組合せて本ポリヌクレオチドに付加できる。これら遺伝子の付加は、慣用の遺伝子工学的手法により行うことができ、遺伝子やmRNAの検出を容易にするために有用である。

[0063] (ベクター)

本発明の一態様は、本発明に係るポリヌクレオチドを含有する組換えベクターに関する。本組換えベクターは、本ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに挿入することにより取得できる。

[0064] ベクターDNAは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するDNAを抽出して得られたベクターDNAの他、複製に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているベクターDNAでもよい。代表的なベクターDNAとして例えば、プラスミド、バクテリオファージおよびウイルス由来のベクターDNAを挙げられる。プラスミドDNAとして、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド等を例示できる。バクテリオファージDNAとして、 λ ファージ等が挙げられる。ウイルス由来のベクターDNAとして例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、パポバウイルス、SV40、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルス等の動物ウイルス由来のベクター、あるいはバキュロウイルス等の昆虫ウイルス由来のベクターが挙げられる。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来のベクターDNA等を例示できる。あるいは、これらを組合せて作成したベクターDNA、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメントを組合せて作成したベクターDNA(コスミドやファージミド等)を例示できる。

[0065] ベクターDNAは、発現ベクターやクローニングベクター等、目的に応じていずれも用いることができる。本発明に係るポリヌクレオチドを含有する組換え発現ベクターは、本ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質の製造に有用である。

[0066] ベクターDNAには、本発明に係るポリヌクレオチドの機能が発揮されるように該ポリヌクレオチドを組み込むことが必要であり、少なくとも本ポリヌクレオチドとプロモーターとをその構成要素とする。これら要素に加えて、所望によりさらに、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列を組合せて自体公知の方法によりベクターDNAに組み込むことができる。かかる遺伝子配列として、リボソーム結合配列、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、および選択マーカー(ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等)等を例示できる。これらから選択した1種類または複数種類の遺伝子

配列をベクターDNAに組込むことができる。

[0067] ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、本ポリヌクレオチドを含む遺伝子を適当な制限酵素により処理して特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼにより再結合する方法が利用できる。あるいは、本ポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが取得できる。

[0068] (形質転換体)

本発明の一態様は、本発明に係る組換えベクターにより、宿主を形質転換して得られる形質転換体に関する。本発明に係るポリヌクレオチドを含有する組換え発現ベクターを導入した形質転換体は、本ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質の製造に有用である。本形質転換体には、本ポリヌクレオチド以外の所望の遺伝子を含有するベクターDNAの1種類または複数種類をさらに導入できる。本ポリヌクレオチド以外の所望の遺伝子を含有するベクターDNAとして、例えば、RhoA、Rac1またはCdc42等のRhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子を含有するベクターDNAが挙げられる。本ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターとRhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターとにより形質転換して得られる形質転換体は、本ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質によるRhoファミリー蛋白質の活性化促進を阻害する化合物の同定方法に使用できる。このような形質転換として好ましくは、本発明に係る組換えベクターとCdc42をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクターとにより形質転換して得られる形質転換体が挙げられる。

[0069] 宿主として、原核生物および真核生物のいずれも用いることができる。原核生物として、例えば大腸菌(エシェリヒアコリ(*Escherichia coli*))等のエシェリヒア属、枯草菌等のバシラス属、シュードモナスプチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属、リゾビウムメリロティ(*Rhizobium meliloti*)等のリゾビウム属に属する細菌が挙げられる。真核生物として、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞等の動物細胞を例示できる。酵母は、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセスポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等が挙げられる。昆虫

細胞は、Sf9細胞やSf21細胞等を例示できる。哺乳動物細胞は、サル腎由来細胞(COS細胞、Vero細胞等)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞や293EBNA細胞等が例示できる。好ましくは哺乳動物細胞を用いる。最も好ましくは、293EBNA細胞を用いる。

[0070] ベクターDNAの宿主細胞への導入は、自体公知の手段が応用され、例えば成書に記載されている標準的な方法(非特許文献9)により実施できる。より好ましい方法として、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEーデキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(ballistic introduction)および感染等が挙げられる。

[0071] 原核生物を宿主とする場合、組換えベクターが該原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明に係るポリヌクレオチド、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。細菌を宿主とする場合、プロモーターは大腸菌等の細菌中で発現できるプロモーターであればいずれも利用可能である。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーター等の人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、いずれも利用可能である。好ましくは例えば、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等を利用できる。

[0072] 哺乳動物細胞を宿主とする場合、組換えベクターが該細胞中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、RNAスプライス部位、本発明に係るポリヌクレオチド、ポリアデニル化部位、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、所望により複製起点が含まれていてもよい。プロモーターは、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、サイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。哺乳動物細胞への組換えベク

ターの導入方法は、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が利用できる。最も好ましくは、リポフェクション法が用いられる。

- [0073] 酵母を宿主とする場合、プロモーターは、酵母中で発現できるプロモーターであれば特に限定されず、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が利用できる。
- [0074] 昆虫細胞を宿主とする場合、組換えベクターの導入方法は、好ましくは例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が利用できる。
- [0075] (蛋白質)
- 本発明の一態様は、本発明に係るポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質に関する。
- [0076] 本発明に係る蛋白質の具体的態様として、例えば配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が挙げられる。より具体的には、かかる蛋白質として配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質を例示できる。本蛋白質において、その第97番目バリン(Val)から第271番目アスパラギン酸(Asp)までのアミノ酸配列にDHDメインが、第297番目ロイシン(Leu)から第394番目ロイシン(Leu)までのアミノ酸配列にPHDメインが存在する。第97番目バリン(Val)から第394番目ロイシン(Leu)までのアミノ酸配列にDH/PHDメインが存在する。
- [0077] 本発明に係る蛋白質としてまた、配列番号3または5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が挙げられる。より具体的には、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質として配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質を例示できる。また、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質として配列番号6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質を例示できる。配列番号4に記載の

アミノ酸配列は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第90番目のリジン(Lys)から第454番目のロイシン(Leu)までのアミノ酸配列に相当する。また、配列番号6に記載のアミノ酸配列は、配列番号4に記載のアミノ酸配列のN末端にメチオニンがペプチド結合により付加されたアミノ酸配列である。すなわち、これら各アミノ酸配列で表わされる蛋白質は、DH/PHドメインを含んでいる。

[0078] 本発明に係る蛋白質は、好ましくはRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質である。かかる蛋白質として、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質を好ましく例示できる。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドと、RhoA、Cdc42およびRac1といった各Rhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子とを共に発現させた動物細胞において、該ポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は各Rhoファミリー蛋白質と結合することがプルダウン法により判明した(実施例3参照)。また、当該動物細胞において、Cdc42の活性化が促進された(実施例4参照)。これらから、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、Rhoファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質のN末端にメチオニンがペプチド結合により付加された蛋白質である。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの発現を目的として該ポリヌクレオチドの5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)を付加した結果、得られた蛋白質である。付加されたメチオニンは、発現された蛋白質の機能に大きな影響を与えない。したがって、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、N末端のメチオニンが付加されていないが、Rhoファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。

[0079] 配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、上記のように、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質と同様、Rhoファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進する

と考えられる。また、これら蛋白質に含まれるDH／PHドメインは、Rhoファミリー蛋白質の活性化に寄与する重要なドメインであることが知られている。

[0080] これらから、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質を含有する蛋白質もRhoファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。かかる蛋白質として、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が挙げられる。また、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードすることから、配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が同様にかかる蛋白質として例示できる。具体的には、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質として、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が例示できる。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質として、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質が挙げられる。これら例示した蛋白質はいずれも、Rhoファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。

[0081] 本発明の範囲には、配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドまたは配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドであって、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質も包含される。

[0082] 本発明に係る蛋白質は上記蛋白質に限定されず、本発明に係るポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質であればいずれも本発明の範囲に包含される。好ましくは、本発明に係るポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質であって、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質が望ましい。かかる蛋白質として、例えば、配列番号1に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオ

チドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、配列番号3若しくは5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、および配列番号4若しくは6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドからなる群より選ばれるいずれか1のポリヌクレオチドの塩基配列と少なくとも70%の相同性を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が挙げられる。また、例えば、上記ポリヌクレオチド群より選ばれるいずれか1のポリヌクレオチドの塩基配列において1乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加等の変異あるいは誘発変異を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質が挙げられる。さらに、上記ポリヌクレオチド群より選ばれるいずれか1のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであって、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質であってもよい。

[0083] 本発明に係るこのような蛋白質として、より具体的には、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質と配列相同性を有し、かつRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質が例示できる。配列相同性は、通常、アミノ酸配列の全体で約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上であることが適当である。さらにより好ましくは、DH/PHドメインを有する蛋白質が望ましい。DH/PHドメインにおける配列相同性は約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上であることが適当である。またDH/PHドメインがその機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を保持していることがさらに好ましい。また、本蛋白質として、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列において1個以上、例えば1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有するアミノ酸配列で表わされ、かつRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質が

例示できる。アミノ酸の変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有する蛋白質が、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質、より好ましくはDH／PHドメインを有する蛋白質である限り特に制限されない。かかる変異を有する蛋白質は、天然において例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じたものであってよく、また天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たものであってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、公知の遺伝子工学的技術を利用して実施できる。変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質(物性、機能、生理活性または免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互の置換は容易に想定される。

[0084] 本発明に係る蛋白質にはさらに、上記蛋白質の部分配列で表わされる蛋白質が包含される。例えば、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質の部分配列で表わされる蛋白質も本発明の範囲に包含される。かかる蛋白質は、その最小単位として好ましくは5個以上、より好ましくは8個以上、さらに好ましくは12個以上、特に好ましくは15個以上の連続するアミノ酸で表わされる。

[0085] 本発明に係る蛋白質はヒト由来の蛋白質であるが、本蛋白質と配列相同性を有し、かつRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質、好ましくはDH／PHドメインを有する蛋白質である限りにおいて、哺乳動物由来の蛋白質、例えばマウス、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラットまたはウサギ等由来の蛋白質も本発明に包含される。

[0086] 本発明に係る蛋白質は、本蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法で発現させた細胞や生体試料から調製したもの、無細胞系合成産物または化学合成産物であってよく、あるいはこれらからさらに精製されたものであってもよい。また、本蛋白質は、本蛋白質をコードする遺伝子を含む細胞において発現しているものであり得る。該細胞は、本蛋白質をコードする遺伝子を含むベクターをトランスフェクションして得られた形質転換体であり得る。

[0087] 本発明に係る蛋白質はさらに、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例え

ばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない限りにおいて改変が可能である。また、N末端側やC末端側に別の蛋白質等を、直接的に、またはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的的手法等を用いて付加することにより標識化したものであつてよい。好ましくは、本蛋白質の基本的な性質が阻害されないような標識化が望ましい。さらに好ましくは、本蛋白質のRhoファミリー蛋白質の活性化促進機能が阻害されないような標識化が好ましい。標識化に用いる物質(標識物質)は、GST、 β -Gal、HRPまたはALP等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、フルオレセインイソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate)またはフィコエリスリン(phycoerythrin)等の蛍光物質類、マルトース結合蛋白質、免疫グロブリンのFc断片あるいはビオチン等が例示できるが、これらに限定されない。また、放射性同位元素による標識化も可能である。標識物質は、1種類または複数種類を組合せて本蛋白質に付加できる。これら標識物質自体またはその機能の測定により、本蛋白質を容易に検出または精製可能であり、また、例えば本蛋白質と他の蛋白質との結合の検出や本蛋白質の機能の測定が可能である。

[0088] (蛋白質の製造方法)

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質の製造方法に関する。本蛋白質は、例えば本蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法(非特許文献9、10、12および13等を参照)により取得可能である。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドの発現が確認されている各種の細胞や組織、またはこれらに由来する培養細胞から常法に従ってcDNAライブラリーをまず調製する。次いで、本蛋白質をコードする遺伝子に選択的にハイブリダイゼーションするプライマーを用いて、該cDNAライブラリーから本ポリヌクレオチドを増幅する。得られたポリヌクレオチドの発現誘導を公知の遺伝子工学的手法を利用して行うことにより、本蛋白質を取得できる。

[0089] 具体的には例えば、本発明に係る形質転換体を培養し、次いで得られた培養物から本蛋白質を回収することにより、本蛋白質を製造できる。本形質転換体の培養は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件および培養方法で行うことができる。培養

は、形質転換体により発現される本蛋白質自体または本蛋白質の機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を指標にして実施できる。あるいは、宿主中または宿主外に産生された本蛋白質自体またはその蛋白質量を指標にして培養してもよく、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

[0090] 本発明に係る蛋白質が形質転換体の細胞内あるいは細胞膜上に発現する場合には、形質転換体を破碎して本蛋白質を抽出する。また、本蛋白質が形質転換体外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離処理等により形質転換体を除去した培養液を用いる。

[0091] 本発明に係る蛋白質は、所望により、形質転換体を培養した培養液または形質転換体から、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種分離操作方法により分離および／または精製できる。分離および／または精製は、本蛋白質の機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を指標にして実施できる。分離操作方法として、例えば硫酸アンモニウム沈殿、限外ろ過、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析法等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。好ましくは、本蛋白質のアミノ酸配列情報に基づき、これらに対する特異的抗体を作製し、該抗体を用いて特異的に吸着する方法、例えば該抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティークロマトグラフィーを用いることが推奨される。

[0092] 本発明に係る蛋白質はまた、一般的な化学合成法により製造できる。蛋白質の化学合成方法として、例えば、固相合成方法、液相合成方法等が知られているがいずれも利用可能である。かかる蛋白質合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていくいわゆるステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメントコンデンセーション法とを包含する。本蛋白質の合成は、そのいずれによっても行うことができる。上記蛋白質合成法において利用される縮合法も常法に従うことができる。縮合法として、例えば、アジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリ

ルアジド)法、DCC+添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)法、ウッドワード法等が例示できる。化学合成により得られる本蛋白質はさらに、上記のような慣用の各種精製方法により適宜精製を行うことができる。

[0093] 本発明に係る蛋白質の部分配列で表わされる蛋白質は、本蛋白質を適当なペプチダーゼにより切断することによっても得ることができる。

[0094] (抗体)

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質を認識する抗体に関する。本抗体は、本蛋白質を抗原として用いて作製できる。抗原として、本蛋白質およびその断片のいずれを用いることもできる。断片を用いるときは、該断片は少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。本蛋白質に特異的な抗体を作成するためには、本蛋白質に固有なアミノ酸配列からなる領域を抗原として用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも該蛋白質またはその断片のアミノ酸配列と同一である必要はなく、その立体構造上の外部への露出部位が好ましい。露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。本抗体は本蛋白質を特異的に認識する抗体であればいずれであってもよく、特に限定されない。本蛋白質を特異的に認識するとは、本蛋白質を認識する、例えば本蛋白質に結合するが、本蛋白質以外の蛋白質は認識しないか、弱く認識することを意味する。認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応により決定できる。

[0095] 抗体の産生には、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、抗原をアジュバントの存在下または非存在下で、単独でまたは担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより抗体が得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用を示さずかつ抗原性を増強せしめる限りにおいて、公知の担体をいずれも使用できる。具体的には、セルロース、重合アミノ酸、アルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニン等を例示できる。アジュバントは、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、Ribi(MPL)、Ribi(TDM)、Ribi(MPL+TDM)、百日咳ワクチン(*Bordetella pertussis* v

accine)、ムラミルジペプチド(MDP)、アルミニウムアジュバント(ALUM)、およびこれらの組み合わせを例示できる。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

- [0096] ポリクローナル抗体は、免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法により取得できる。好ましい抗体回収手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法が挙げられる。
- [0097] モノクローナル抗体は、免疫手段が施された動物から抗体産生細胞(例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球)を回収し、自体公知の永久増殖性細胞(例えば、P3-X63-Ag8株等のミエローマ株)への形質転換手段を導入することにより生産できる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化する。クローン化した種々のハイブリドーマから、本発明に係る蛋白質を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。
- [0098] 本発明に係る蛋白質を認識または結合し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該蛋白質の精製用抗体、試薬または標識マーカール等として利用できる。特に本蛋白質の機能を阻害する抗体は、本蛋白質の機能調節に使用でき、本蛋白質の機能異常や量的異常に起因する各種疾患の解明、防止、改善および／または治療のために有用である。
- [0099] (化合物の同定方法)
- 本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質の機能を阻害する化合物、あるいは本発明に係るポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法に関する。本同定方法は、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体または抗体のうち少なくともいずれか1種類を用いて、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施できる。本同定方法は、インビトロまたはインビボで実施されるいずれの方法も包含する。本同定方法により、本蛋白質の立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現の阻害剤の選別、または抗体を利用した抗体認識物質の選別等が実施できる。
- [0100] 本発明に係る蛋白質の機能を阻害する化合物の同定方法は、本蛋白質の機能を

測定し得る実験系において、本蛋白質と調べようとする化合物(被検化合物)の相互作用を可能にする条件下で、本蛋白質と被検化合物とを共存させてその機能を測定し、次いで、被検化合物の存在下における本蛋白質の機能と、被検化合物の非存在下における本蛋白質の機能とを比較し、本蛋白質の機能の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより実施可能である。被検化合物の非存在下における本蛋白質の機能と比較して、被検化合物の存在下における本蛋白質の機能が低減または消失する場合、該被検化合物は本蛋白質の機能を阻害すると判定できる。機能の測定は、該機能の直接的な検出により、または例えば機能の指標となるシグナルを実験系に導入して該シグナルを検出することにより実施できる。シグナルは、GST等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、または蛍光蛋白質等が例示できるが、一般的に化合物の同定方法に用いられている標識物質であればいずれも利用できる。

[0101] 本発明に係る蛋白質の機能として、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能およびRhoファミリー蛋白質と結合する機能が挙げられる。

[0102] 本発明に係る蛋白質のRhoファミリー蛋白質との結合機能を指標にした同定方法は、例えば、本蛋白質を遺伝子工学的手法により発現させて取得し、被検化合物の存在下または非存在下におけるRhoファミリー蛋白質との結合の検出を行うことにより実施できる。具体的には、例えばRhoファミリー蛋白質を遺伝子工学的手法によりGST-tag融合蛋白質として発現させ、その後グルタチオンセファロースに結合させ、被検化合物の存在下または非存在下で、本蛋白質と反応させる。グルタチオンセファロースに結合させたRhoファミリー蛋白質に結合する本蛋白質を定量することにより、本蛋白質のRhoファミリー蛋白質との結合機能を阻害する化合物の同定が可能である。被検化合物の非存在下における両蛋白質の結合と比較して、被検化合物の存在下における両蛋白質の結合が低減または消失する場合、該被検化合物は本蛋白質のRhoファミリー蛋白質との結合機能を阻害すると判定できる。本蛋白質の定量は、例えば、本発明に係る抗体を用いて実施できる。抗体は、HRPやALP等の酵素、放射性同位元素、蛍光物質またはビオチン等の標識物質で標識した抗体を用いることができる。あるいは、標識した二次抗体を用いてもよい。本蛋白質として、タグペ

プチドを融合した蛋白質を用いれば、抗タグ抗体を用いて定量を実施できる。または、本蛋白質を上記酵素、放射性同位元素、蛍光物質、ビオチン等の標識物質で直接標識して用いてもよい。このような場合、標識物質を測定することにより、本蛋白質の定量を実施できる。

[0103] より具体的には、本発明に係る蛋白質をコードするポリヌクレオチドとRhoファミリー蛋白質をコードするポリヌクレオチドとを共発現させた適当な細胞を用い、両蛋白質の結合をプルダウン法により検出する実験系(実施例3参照)を用いて、該結合を阻害する化合物を同定できる。

[0104] 本発明に係る同定方法に、公知のツーハイブリッド(two-hybrid)法を用いることもできる。例えば、本発明に係る蛋白質とDNA結合蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、Rhoファミリー蛋白質と転写活性化蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したレポーター遺伝子を含有するプラスミドを、酵母または真核細胞等に導入する。次いで、被検化合物の存在下におけるレポーター遺伝子の発現量と、被検化合物の非存在下におけるレポーター遺伝子の発現量との比較により、本蛋白質とRhoファミリー蛋白質との結合を阻害する化合物の同定を達成できる。被検化合物の非存在下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、被検化合物の存在下におけるレポーター遺伝子の発現量が減少または消失する場合、該被検化合物は本蛋白質のRhoファミリー蛋白質との結合機能を阻害すると判定できる。レポーター遺伝子は、レポーターアッセイで一般的に用いられている遺伝子をいずれも用いることができるが、ルシフェラーゼ、 β -Galまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ等の酵素活性を有する遺伝子を例示できる。レポーター遺伝子の発現の検出は、その遺伝子産物の活性、例えば、上記例示したレポーター遺伝子の場合には酵素活性を検出することにより実施できる。

[0105] 本発明に係る蛋白質とRhoファミリー蛋白質との結合を阻害する化合物の同定方法はまた、ビアコアシステム(BIACORE system)等の表面プラズモン共鳴センサーを用いて実施できる。あるいは、シンチレーションプロキシミティアッセイ法(Scintillation proximity assay、SPA)や蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence re

sonance energy transfer、FRET)を応用した方法を用いて、本同定方法を実施できる。

[0106] 本発明に係る蛋白質が有するRhoファミリー蛋白質の活性化促進機能を指標にした同定方法は、例えば、本蛋白質と該蛋白質により活性化が促進されるRhoファミリー蛋白質とを共存させ、活性化されたRhoファミリー蛋白質の量を、被検化合物の存在下または非存在下において測定することにより実施できる。被検化合物の非存在下における活性化されたRhoファミリー蛋白質の量と比較し、被検化合物の存在下における該蛋白質の量が減少する場合、該化合物は、本蛋白質が有するRhoファミリー蛋白質の活性化促進機能を阻害すると判定できる。活性化されたRhoファミリー蛋白質は、該蛋白質に対する抗体等を用いて定量され得る。例えば、活性化されたRhoファミリー蛋白質は、活性化されたRhoファミリー蛋白質には結合するが、活性化されていないRhoファミリー蛋白質には結合しないか弱く結合するエフェクター分子を用いて定量され得る。具体的には、実施例4に示すように、エフェクター分子の活性化されたRhoファミリー蛋白質との結合部位を含む蛋白質にGST-tagを付加した蛋白質と、活性化されたRhoファミリー蛋白質との結合をプルダウン法により検出し、さらに活性化されたRhoファミリー蛋白質の量を電気泳動法およびウエスタンブロット法により測定する。Rhoファミリー蛋白質によって、活性化された該蛋白質と結合するエフェクター分子は異なる。したがって、用いるRhoファミリー蛋白質の種類により適当なエフェクター分子を選択して用いる。例えば、活性化されたCdc42および活性化されたRac1は、そのエフェクター分子であるPAK-1に結合することが知られている。また、活性化されたRhoAは、そのエフェクター分子であるRhotekinに結合する。

[0107] 本発明に係る蛋白質が有するRhoファミリー蛋白質の活性化促進機能を指標にした同定方法はまた、本蛋白質、該蛋白質により活性化が促進されるRhoファミリー蛋白質であって放射性同位元素で標識したGDPと結合しているRhoファミリー蛋白質およびGTPを共存させ、活性化されたRhoファミリー蛋白質の量を被検化合物の存在下または非存在下において測定することにより実施できる。活性化されたRhoファミリー蛋白質は、放射性同位元素で標識したGDPと結合しているRhoファミリー蛋白質

質の量の減少により定量され得る。

- [0108] 「Rhoファミリー蛋白質の活性化促進機能を阻害する」とは、本発明に係る蛋白質により促進される、Rhoファミリー蛋白質の活性化において、該促進を阻害することを意味する。
- [0109] 本発明に係る同定方法において用いるRhoファミリー蛋白質は、本発明に係る蛋白質との結合および本蛋白質による活性化の促進に影響がない限りにおいて、一部を欠損した蛋白質であつてよく、あるいは上記のような標識物質が付加された蛋白質であつてよい。
- [0110] 本発明に係るポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法は、本ポリヌクレオチドの発現を測定し得る実験系において、本ポリヌクレオチドと被検化合物の相互作用を可能にする条件下で、本ポリヌクレオチドと被検化合物とを共存させてその発現を測定し、次いで、被検化合物の存在下における本ポリヌクレオチドの発現と、被検化合物の非存在下における本ポリヌクレオチドの発現とを比較し、本ポリヌクレオチドの発現の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより実施できる。被検化合物の非存在下における本ポリヌクレオチドの発現と比較して、被検化合物の存在下における本ポリヌクレオチドの発現が減少または消失する場合、該被検化合物は本ポリヌクレオチドの発現を阻害すると判定できる。具体的には例えば、本同定方法は、本発明に係る形質転換体を用いて本ポリヌクレオチドを発現させる実験系において、該形質転換体と被検化合物とを接触させた後に、本ポリヌクレオチドの発現を測定することにより実施できる。発現の測定は、簡便には発現される蛋白質の量、あるいは該蛋白質の機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を指標にして実施できる。また、例えば発現の指標となるシグナルを実験系に導入して該シグナルを検出することにより、発現の測定を実施できる。シグナルは、GST等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、または蛍光物質等が例示できる。これらシグナルの検出方法は当業者には周知である。
- [0111] 本発明に係るポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法はまた、例えば本ポリヌクレオチドを含む遺伝子のプロモーター領域の下流に、該ポリヌクレオチドの

代わりにレポーター遺伝子を連結したベクターを作成し、該ベクターを導入した細胞、例えば真核細胞等と被検化合物とを接触させ、レポーター遺伝子の発現の存在、不存在または変化を測定することにより実施できる。レポーター遺伝子は、レポーターアッセイで一般的に用いられている遺伝子をいずれも用いることができるが、ルシフェラーゼ、 β -Galまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ等の酵素活性を有する遺伝子を例示できる。レポーター遺伝子の発現の検出は、その遺伝子産物の活性、例えば、上記に例示したレポーター遺伝子の場合は酵素活性を検出することにより実施できる。

[0112] (化合物)

本発明に係る同定方法により得られた化合物は、本発明に係る蛋白質の機能、例えばRhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能の阻害剤や拮抗剤等の候補化合物として利用できる。また、本発明に係るポリヌクレオチドの発現阻害剤の候補化合物として利用できる。これら候補化合物は、その有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより医薬として調製でき、ゆえに本蛋白質の機能の異常および／または本ポリヌクレオチドの発現の異常に起因する各種病的症状の防止効果および／または治療効果を期待できる。また、本発明に係る化合物は、本同定方法以外の方法により得られた化合物であって、本蛋白質の機能を阻害するおよび／または本ポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物も含まれる。

[0113] (医薬組成物)

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、または化合物を有効成分として含み、本蛋白質の機能および／または本ポリペプチドの発現を阻害するまたは拮抗することに基づく医薬または医薬組成物に関する。

[0114] 本発明に係る医薬は、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、または化合物のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよい。通常は、1種類または2種類以上の医薬用に許容される担体(医薬用担体)を用いて医薬組成物を製造することが好ましい。

[0115] 本発明に係る医薬組成物中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択さ

れる。通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。

[0116] 医薬用担体は、医薬組成物の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等が例示できる。これらは得られる医薬組成物の使用形態に応じて適宜選択して使用される。

[0117] 例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る医薬組成物の使用形態に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

[0118] 所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して医薬組成物を調製することもできる。

[0119] 安定化剤は、ヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等が例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。

[0120] 界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエス

テル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。

- [0121] 緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等が例示できる。
- [0122] 等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等が例示できる。
- [0123] キレート剤は、エデト酸ナトリウム、クエン酸等が例示できる。
- [0124] 本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる。その他、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することもできる。
- [0125] 本発明に係る医薬および医薬組成物は、本発明に係る蛋白質の機能の異常および／または本ポリヌクレオチドの発現の異常に基づく疾患の防止剤および／または治療剤として使用できる。また、当該疾患の防止方法および／または治療方法に使用できる。
- [0126] 本発明に係る蛋白質の機能および／または本発明に係るポリヌクレオチドの発現の過剰に関連する異常な症状に対しては、例えば本蛋白質の機能および／または本ポリヌクレオチドの発現を阻害する有効量の阻害剤を医薬用担体とともに対象に投与することにより、異常な症状を防止、改善または治療するといった効果を得ることができる。あるいは、内在性の本ポリヌクレオチドの発現を発現ブロック法を用いて阻害することにより同様の効果が得られる。本ポリヌクレオチドの発現の阻害は、例えば本ポリヌクレオチドの部分配列からなるオリゴヌクレオチドをアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることにより実施できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いるオリゴヌクレオチドは、本ポリヌクレオチドの翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものであっても有用である。本ポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害するためには、該ポリヌクレオチドに固有な領域の塩基配列を用いることが好ましい。
- [0127] 本発明に係るポリヌクレオチドの一態様である配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの組織発現は、胃腫瘍の1つである胃腺癌様腫瘍 (stomach adenocarcinoid tumor) で正常胃組織と比較して約5倍、4.5倍以上

高いことが判明した。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質にはRho-GEFの活性ドメインであるDH/PHドメインが存在する。一方、配列番号1に記載の塩基配列の第581番目から第1675番目までの塩基配列で表わされるポリヌクレオチド(配列番号3)の5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)が付加されたポリヌクレオチド(配列番号5)は、DH/PHドメインコード領域を有し、Rhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子と共発現させた動物細胞において、Rhoファミリー蛋白質と結合しその活性化を促進した。このことから、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質は、Rho-GEFとして作用すると考えられる。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの5'末端に付加されたコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)は、発現された蛋白質の機能に大きな影響を与えない。したがって、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質も、Rho-GEFとして作用すると考える。また、配列番号1に記載の塩基配列は配列番号3に記載の塩基配列を含むため、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質も、Rhoファミリー蛋白質と結合してRho-GEFとして作用すると考えられる。Rho-GEFとして単離された遺伝子には、*vav*(非特許文献3および4)、*ost*(非特許文献5)、*ibc*(非特許文献6)等の癌に関連する遺伝子が知られている。これらから、本ポリヌクレオチドの高発現は胃腫瘍に関連すると考える。したがって、本発明に係る医薬および医薬組成物は、胃腫瘍の防止剤および／または治療剤として有用である。さらに、胃腫瘍の防止方法および／または治療方法に使用できる。

[0128] 本発明に係る医薬および医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質(体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等)、および担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01 μ g～100mg程度、好ましくは約0.1 μ g～1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれら

の用量の変更を行うことができる。上記投与量は1日1～数回に分けて投与することができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。

[0129] 本発明に係る医薬または医薬組成物を投与するときは、該医薬または医薬組成物を単独で使用してよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

[0130] 投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択できる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内等への投与が挙げられる。あるいは経口経路で投与できる。さらに、経粘膜投与または経皮投与も実施できる。癌疾患に用いる場合は、腫瘍に注射等により直接投与することが好ましい。

[0131] 投与形態は、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的な例として、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

[0132] (診断方法)

本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、抗体または化合物は、それ自体を、診断マーカーや診断試薬等の疾患診断手段として使用できる。

[0133] 本発明によれば、例えば本発明に係るポリヌクレオチドの一部または全部のポリヌクレオチドを利用することにより、個体または各種組織における該ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む遺伝子の異常の有無あるいは発現の有無を特異的に検出できる。本発明に係るポリヌクレオチドの検出により、該ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む遺伝子の量的異常および／または機能異常等に基づく疾患の易罹患性、発症、および／または予後の診断が実施できる。

[0134] 疾患の診断は、例えば調べようとする試料（被検試料）について、本発明に係るポリ

ヌクレオチドの存在を検出すること、その存在量を決定すること、および／またはその変異を同定することにより実施できる。正常な対照試料との比較において、本ポリヌクレオチドの存在の変化、その量的変化を検出できる。あるいは、正常遺伝子型との比較において本ポリヌクレオチドを公知の手法により増幅した増幅生成物について、例えばサイズ変化を測定することにより、欠失や挿入といった変異を検出できる。また、被検試料から増幅したポリヌクレオチドを、例えば標識した本ポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。かかる変化および変異の検出により、上記診断を実施できる。

[0135] 本発明は、被検試料中の本発明に係るポリヌクレオチドの定性的または定量的な測定方法、または該ポリヌクレオチドの特定領域における変異の定性的または定量的な測定方法をも提供できる。

[0136] 配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの組織発現は、胃腫瘍の1つである胃腺癌様腫瘍で正常胃組織と比較して約5倍、4.5倍以上高いことが判明した。また、上述したように、該ポリヌクレオチドの高発現は胃腫瘍に関連すると考えられる。したがって、被検試料中の該ポリヌクレオチドの発現量の増加を検出することにより、該被検試料が胃腫瘍由来の被検試料であるか否かを判定する方法を実施できる。このような判定方法も本発明の範囲に包含される。本判定方法において該ポリヌクレオチドの発現量の増加は、被検試料と正常な対照試料とを比較することにより検出できる。被検試料として、好ましくはヒト胃組織由来の被検組織が挙げられる。対照試料として、好ましくはヒト正常胃由来組織が挙げられる。該ポリヌクレオチドの発現量が対照試料と比較して増加している場合、好ましくは約4.5倍以上、より好ましくは約5倍以上に増加している場合、被検試料がヒト胃腫瘍由来試料であると判定できる。本判定方法はまた、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの代わりに、該ポリヌクレオチドを除く本発明に係るポリヌクレオチドを用いて実施できる。かかるポリヌクレオチドとして例えば、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが挙げられる。本発明に係るポリヌクレオチドの発現量とは、該ポリヌクレオチドの転写産物の量を意味する。

[0137] 被検試料は、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子また

はその変異遺伝子の核酸を含む限りにおいて特に制限されず、例えば、細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等の生体生物由来の試料を例示できる。あるいは所望により試料から核酸を抽出して核酸試料を調製して用いることもできる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。核酸試料は、また、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットブロッキング等により調製してもよい。

[0138] 本発明に係るポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む遺伝子の検出には、自体公知の遺伝子検出法がいずれも使用できる。具体的には、プラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンブロット法、ノザンブロット法、NASBA法、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)等が例示できる。また、in situ RT-PCRやin situ ハイブリダイゼーション等を利用した細胞レベルでの測定により検出できる。このような遺伝子検出法において、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子の同定および／またはその増幅の実施に、本ポリヌクレオチドの部分配列からなるオリゴヌクレオチドであってプローブとしての性質を有するものまたはプライマーとしての性質を有するものが有用である。プローブとしての性質を有するオリゴヌクレオチドとは、本ポリヌクレオチドのみに特異的にハイブリダイゼーションできる該ポリヌクレオチド特有の配列からなるものを意味する。プライマーとしての性質を有するものとは本ポリヌクレオチドのみを特異的に増幅できる該ポリヌクレオチド特有の配列からなるものを意味する。また、増幅できる変異遺伝子を検出する場合には、遺伝子内の変異を有する箇所を含む所定の長さの配列を持つプライマーあるいはプローブを作成して用いる。プローブまたはプライマーとして、塩基配列長が一般的に5乃至50ヌクレオチド程度であるものが好ましく、10乃至35ヌクレオチド程度であるものがより好ましく、15乃至30ヌクレオチド程度であるものがさらに好ましい。本発明に係るポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するためのプライマー、あるいは本ポリヌクレオチドを検出するためのプローブとして、具体的には、配列番号7、8、9または10に記載の塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドを好ましく例示できる。プローブは、通常は標識したプローブを用いるが

、非標識であってもよい。また、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合により検出してもよい。プローブおよびリガンドを標識する方法は、種々の方法が知られており、例えばニクトランスレーション、ランダムプライミングまたはキナーゼ処理を利用する方法等を例示できる。適当な標識物質として、放射性同位体、ビオチン、蛍光物質、化学発光物質、酵素、抗体等が挙げられる。

[0139] 遺伝子検出法は、PCRが感度の点から好ましい。PCRは、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを用いる方法である限り、従来公知の方法のいずれも使用できる。例えばRT-PCRが挙げられるが、その他、当該分野で用いられる種々のPCRの変法を適応できる。

[0140] PCRにより、遺伝子の検出の他に、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子のDNAの定量も実施できる。かかる分析方法として、MSSA法等の競合的定量法、または一本鎖DNAの高次構造の変化に伴う移動度の変化を利用した突然変異検出法として知られるPCR-SSCP法を例示できる。

[0141] 本発明によればまた、例えば本発明に係る蛋白質を利用することにより、個体若しくは各種組織における該蛋白質およびその機能の異常の有無を特異的に検出できる。本発明に係る蛋白質およびその機能の異常の検出により、該蛋白質の量的異常および／または機能の異常に基づく疾患の易罹患性、発症、および／または予後の診断を実施できる。

[0142] 蛋白質の検出による疾患の診断は、例えば被検試料について、該蛋白質の存在を検出すること、その存在量を決定すること、および／またはその変異を検出することにより実施できる。すなわち、本発明に係る蛋白質および／またはその変異体を量的あるいは定性的に測定する。正常な対照試料との比較において、本蛋白質の存在の変化、その量的変化を検出できる。正常蛋白質との比較において、例えばアミノ酸配列を決定することによりその変異を検出できる。かかる変化および変異の検出により、上記診断を実施できる。被検試料は、本蛋白質および／またはその変異体を含むものである限り特に制限されず、血液、血清、尿、生検組織等の生体生物由来

の生物学的試料が例示できる。

- [0143] 本発明に係る蛋白質および変異を有する該蛋白質の測定は、本発明に係る蛋白質、例えば配列表の配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質、または該蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは数個乃至複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列で表わされる蛋白質、これらの断片、または該蛋白質やその断片に対する抗体を用いて実施できる。
- [0144] 蛋白質の定量的あるいは定性的な測定は、この分野における慣用技術による蛋白質検出法あるいは定量法を用いて実施できる。例えば、本蛋白質のアミノ酸配列分析により変異蛋白質を検出できる。さらに好ましくは、抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル抗体)を用いて、蛋白質の配列の相違、または蛋白質の有無を検出する。
- [0145] 本発明は、被検試料中の本蛋白質の定性的または定量的な測定方法、または該蛋白質の特定領域の変異の定性的または定量的な測定方法を提供できる。
- [0146] 具体的には、被検試料について、本蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法またはイムノブロット法で本蛋白質の解析を行うことにより、上記検出を実施できる。また、本蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫組織化学的技術によりパラフィンまたは凍結組織切片中の本蛋白質を検出できる。
- [0147] 本蛋白質またはその変異体を検出する方法の好ましい具体例として、モノクローナル抗体および／またはポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素免疫測定法(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)、免疫放射線検定法(IRMA)、および免疫酵素法(IEMA)等が挙げられる。その他、ラジオイムノアッセイや競争結合アッセイ等を利用することもできる。
- [0148] 本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、および抗体はいずれも、それ自体を単独であるいは組合わせて、試薬等として使用できる。試薬は、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、および抗体のうちの少なくとも1種類の他に、緩衝液、塩、安定化剤、および／または防腐剤等の物質を含むことができる。なお、製剤化にあたっては、各性質に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。該試薬は、例えば、本発明に係る判定方法、化合物の同定方法、あるいは本蛋白質または本ポリヌクレオチドの測定方法に使用できる

。該試薬はその他、本発明に係る蛋白質またはポリヌクレオチドが関与する細胞内情報伝達経路の解明、および該蛋白質またはポリヌクレオチドの異常に基づく疾患等に関する基礎的研究等に有用である。

[0149] 本発明はまた、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、および抗体のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キットを提供する。試薬キットにはその他、本発明に係る蛋白質やポリヌクレオチドを検出するための標識物質、標識の検出剤、反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤および反応停止液等、測定の実施に必要とされる物質を含むことができる。標識物質として、上述の蛋白質や放射性同位元素等が挙げられる。標識物質は、予め本発明に係る蛋白質あるいはポリヌクレオチドに付加されていてもよい。本試薬キットは、本発明に係る判定方法、化合物の同定方法、あるいは本蛋白質または本ポリヌクレオチドの測定方法に使用できる。さらに、本試薬キットは、前記測定方法を用いる検査方法に、検査剤並びに検査用キットとして使用できる。また、前記測定方法を用いる診断方法にも、診断剤並びに診断用キットとして使用できる。

[0150] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。

実施例 1

[0151] (ヒト脳由来cDNAライブラリーの構築と遺伝子の分取)

ヒトの脳、胎児脳および脳海馬由来のpolyA⁺RNA(Clontech社製:カタログNo. 6516-1、6525-1および6578-1)を出発原料として常法によりcDNAライブラリーを構築し、dbEST分析によりcDNA断片を単離してcDNAクローンの塩基配列を決定した。具体的には、小原らの方法(非特許文献19)に従って調製した上記ヒト脳由来のcDNAライブラリーから、約50,000個の組換え体をランダムに選択し、のうち約30,000個のクローンのcDNAについて、その5'末端および3'末端の塩基配列を決定した。さらに約1,100個のクローンを主にインビトロの転写翻訳実験により選択し、それらcDNAの塩基配列を小原らの方法に従って決定した。

[0152] 全塩基配列の決定を行ったcDNAクローンについて、コンピュータプログラムを用いた汎用解析方法によりORFを予想した。次いで、ORF領域についてモチーフドメイン検索を行い、Rho-GEFの活性ドメインであるDH/PHドメインをコードする領

域を含むcDNAを同定した。

- [0153] 同定したcDNAクローンhj03796は、全長4977bpの新規な塩基配列を有するDNA(配列番号1)であり、1340アミノ酸(配列番号2)をコードするORFを含む。DHドメインは配列番号2に記載のアミノ酸配列の第97番目のバリン(Val)から第271番目のアスパラギン酸(Asp)までの175アミノ酸残基からなる。PHドメインは配列番号2に記載のアミノ酸配列の第297番目のロイシン(Leu)から第394番目のロイシン(Leu)までの98アミノ酸残基からなる。DHドメインおよびPHドメインをコードする領域はそれぞれ、配列番号1に記載の塩基配列の第602番目から第1126番目のヌクレオチドおよび第1202番目から第1495番目のヌクレオチドに相当する。

実施例 2

- [0154] (DNAの発現と精製)

実施例1で同定したクローンhj03796を用いて、該クローンがコードする蛋白質をFLAG-tag融合蛋白質として293EBNA細胞(Invitrogen社製)で発現させた。また、クローンhj03796がコードする蛋白質の部分配列からなりDH/PHドメインを含む蛋白質を293EBNA細胞を用いて発現させた。発現の確認はウエスタンブロット法により行った。

- [0155] まず、hj03796遺伝子を含む発現ベクターを構築した。テンプレートとしてpBluescript II-hj03796(hj03796はpBluescript II SK⁺のSalI-NotIサイトに挿入されている:かずさDNA研究所製)、プライマーとしてK0599s3(配列番号7)およびasBam1(配列番号8)を用いてpfu turbo(Stratagene社製)にて遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子をHincII/BamHIで切断して得た遺伝子断片、pBluescript II-hj03796をSalI/HincIIで切断した遺伝子断片、およびpDsRed2-N1(Clontech社製)をSalI/BamHIで切断した遺伝子断片をライゲーションし、コンピテントセルに導入した。次いで、形質転換した大腸菌から精製キットを用いてDNAを精製した。精製DNAをSalI/BamHIで切断して得られたhj03796フラグメントを、ベクターDNAであるpFLAG-CMV5b(SIGMA社製)のSalI/BamHIサイトに挿入し、hj03796発現ベクターを得た。制限酵素処理を行った塩基配列が正しく挿入されていることは、シーケンスを行なって確認した。シーケンス反応はDNA Sequencing

Kit (ABI社製)を、泳動および解析はABI PRISM 377を用いて行なった。

[0156] 次に、hj03796クローンがコードする全長蛋白質の部分配列からなる蛋白質であってDH/PHドメインを含む蛋白質(以下、hj03796DH/PHと称する)を発現させるためのベクターを、ゲートウェイTMクローニングテクノロジー(Invitrogen社製)を用いて構築した。pBluescriptII-hj03796をテンプレートとし、pfu turboを用いて、proto-DblのDH/PHドメインコード領域と相同性のある領域(配列番号1の第581番目から第1675番目のヌクレオチドに相当)の5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)が付加されたポリヌクレオチドを増幅した。その後、増幅産物をTOPOクローニングシステムを用いた反応にてpENTR/SD/D-TOPOに挿入し、エントリーベクターを作製した。増幅反応にはプライマーとして、03796D/P-F1(配列番号9)および03796D/P-R3(配列番号10)を使用した。次いで、上記エントリーベクターとC末端FLAG-tag(3×)融合蛋白質発現ベクターを用いて、LRクロナーゼによる組換え反応により、hj03796DH/PHをFLAG-tag(3×)融合蛋白質として発現させるための発現ベクターを作製した。hj03796のDH/PHドメインコード領域の塩基配列が正しく挿入されていることは、シーケンスを行って確認した。シーケンス反応はDYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Biosciences社製)を、泳動および解析はABI PRISM 377を用いて行なった。

[0157] hj03796DH/PHの比較対照として、既知Rho-GEFであるproto-DblのDH/PHドメイン(以下、proto-Dbl DH/PHと称する)を用いるためにその発現ベクターを構築した。マルチプルティシューcDNAパネルズ(Multiple Tissue cDNA Panels、Clontech社製)のブレインファーストストランドDNA(brain first strand DNA)をテンプレートとし、pfu turboを用いてproto-DblのDH/PHドメインコード領域(proto-Dblの塩基配列中の開始ATGコドンより第1485番目から第2429番目)を増幅した。その後、増幅産物をライゲーション反応にてpFLAG-CMV5a(SIGMA社製)のBglII-SalIサイトに挿入し、proto-Dbl DH/PHをFLAG-tag融合蛋白質として発現させるための発現ベクターを作製した。増幅反応にはプライマーとして、D/P-s1(BglII)(配列番号11)およびD/P-as1(SalI)(配列番

号12)を使用した。proto-DblのDH/PHドメインコード領域の塩基配列が正しく挿入されていることをシーケンスにより確認したところ、1塩基が公開配列と異なることが明らかになった。しかし、この1塩基の差異によるアミノ酸置換は認められなかった。具体的には、発現ベクターに挿入されたproto-DblのDH/PHドメインコード領域の塩基配列は、proto-Dblの公開配列(アクセッション番号:X12556)と比較し、その公開配列の開始ATGコドンより第1962番目の塩基であるT(チミン)がA(アデニン)となった塩基配列である。発現ベクターに挿入されたproto-DblのDH/PHドメインコード領域の塩基配列は、proto-Dblの公開配列の開始ATGコドンより第1480番目から第2433番目までの塩基配列の5'末端にATGGCAが付加されている塩基配列である。したがって、発現ベクターに挿入されたproto-DblのDH/PHコード領域において、その開始ATGコドンより第489番目の塩基が公開配列の対応する塩基と異なっている。公開配列の開始ATGコドンより第1960番目から第1962番目までの塩基はGGTであり、グリシンをコードしている。一方、発現ベクターに挿入されたproto-DblのDH/PHコード領域の塩基配列の開始ATGコドンより第487番目から第489番目までの塩基はGGAであり、同様にグリシンをコードしている。すなわち、1塩基の差異によるアミノ酸置換は認められなかった。proto-Dblの公開塩基配列および該公開塩基配列にコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号26および27に示す。配列番号26に示したproto-Dblの塩基配列は、2005年2月24日にNCBI(National Center for Biotechnology Information)公開データベースを閲覧したときに公開されていた塩基配列である。

- [0158] 各発現ベクターは、293EBNA細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションした。すなわち、各発現ベクターを添加した無血清のDMEMとリポフェクトアミン2000(LipofectAMINE2000、Invitrogen社製)を添加したDMEMとを混合し、室温で20分間インキュベーションした。得られた混合液を、前日播種して37℃にて5%CO₂存在下で培養した293EBNA細胞に添加した。遺伝子導入処理した細胞は37℃にて5%CO₂存在下で2日間インキュベーションした。培養終了後、エチレンジアミン四酢酸を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS-EDTA)にて細胞を洗浄し、プロテアーゼインヒビターカクテル(protease inhibitor cocktail、1/100濃度、SIGMA社

製) 1%を含む溶解バッファー(Lysis buffer)にて細胞を溶解して細胞溶解液を調製した。溶解バッファーは、次の組成からなる: 25mM Tris-HCl, pH7. 5; 150 mM NaCl; 1mM CaCl_2 ; および1% Triton X-100。

[0159] 各細胞溶解液は、等量のSDS-PAGEサンプルバッファーと混合し、加熱処理(100°Cで5分間)して電気泳動用サンプルを調製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動ゲルをブロッキングバッファーに5分間以上浸して平衡化した後、PVDF膜上に蛋白質をトランスファーした。ブロッキング終了後のPVDF膜は、TBS-Tにブロックエース(大日本製薬株式会社製)を3:1の割合で混合した溶液(TBS-T+BA)に4°Cで一晩浸してブロッキングした。ブロッキング終了後に、PVDF膜をTBS-Tにて10分以上振とうしながら1回洗浄した。上記で用いたSDS-PAGEサンプルバッファーは、次の組成からなる: 1. 7% Tris; 0. 13M HCl; 22% グリセロール; 4. 6% SDS; および0. 22g/mL ブロモフェノールブルー。ブロッキングバッファーは、次の組成からなる: 25mM Tris; 40mM ϵ -アミノ-n-カプロン酸; 20%メタノール; および0. 05% SDS。TBS-Tは、次の組成からなる: 150mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH7. 5; および0. 05% Tween-20。

[0160] 抗FLAG M2モノクローナル抗体(SIGMA社製)をTBS-T+BAで1000倍希釈してPVDF膜に添加し、37°Cで1時間以上保温した。その後、PVDF膜をTBS-Tにて3回洗浄し(1回の洗浄に付き10分以上の振とう)、TBS-T+BAで1000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体(Cell Signaling Technology社製)を添加して、37°Cで1時間以上保温した。最終的に、PVDF膜をTBS-Tにて3回洗浄した後(1回の洗浄に付き10分以上の振とう)、ECLプラスウエスタンブロッティングデテクションシステム(Amersham Biosciences社製)により、抗FLAG抗体に反応する発現蛋白質を検出した。化学発光シグナルは検出装置(Lumino Imaging Analyzer、東洋紡績株式会社製)にて可視化した。

[0161] 結果を図1に示す。FLAG-tag融合蛋白質として発現させたhj03796は、220KDaから97. 4KDaの間に単一バンドとして検出された(図1内レーン1)。hj03796DH/PHは、抗FLAG抗体により約50KDaに単一バンドとして検出された(図1内レーン4)。hj03796がコードする蛋白質(以下、hj03796蛋白質と称する)およびhj0

3796DH/PHの予想分子量はそれぞれ約150KDaおよび約43KDaである。このことから、上記単一バンドは、それぞれhj03796およびhj03796DH/PHであることが明らかになった。また、proto-Dbl DH/PHは、抗FLAG抗体により約40KDaに単一バンドとして検出された(図1内レーン2およびレーン5)。ベクターを導入しなかったコントロール細胞から同様の処理により得た蛋白質溶液では、かかるバンドはいずれも検出されなかった(レーン3および6)。

- [0162] かくして、hj03796蛋白質、hj03796DH/PH、およびproto-Dbl DH/PHを得ることができた。

実施例 3

- [0163] (Rhoファミリー蛋白質との結合の検出)

実施例2で構築したhj03796DH/PH(C末端FLAG-tag融合蛋白質)発現ベクターを用いて、hj03796DH/PHとRhoファミリー蛋白質との結合について、プルダウン法により検討した。

- [0164] Rhoファミリー蛋白質として、Cdc42、RhoAおよびRac1を用いた。これら蛋白質をN末端GST-tag融合蛋白質として発現させるための発現ベクターは後述するように構築した。

- [0165] 陽性コントロールとしてproto-Dbl DH/PHを用いた。proto-Dbl DH/PH(C末端FLAG-tag融合蛋白質)発現ベクターは実施例2で構築した発現ベクターを用いた。proto-DblはRho-GEFのプロトタイプであり、proto-Dblの活性化はoncogenic activationと考えられている。proto-Dblの活性化は、そのアミノ酸配列のN末端側(第1番目から第497番目のアミノ酸)の欠失により起こる。すなわち、proto-DblのC末端側のDH/PHドメインを含む領域(oncogenic-Dbl)がRhoファミリー蛋白質を活性化することが報告されている(非特許文献1)。本実施例において用いたproto-Dbl DH/PHはproto-Dblの第494番目から第811番目までのアミノ酸を有する欠失変異体であり、oncogenic-Dblより短い配列である。oncogenic-Dblは、Cdc42、RhoAおよびRac1と結合するが、Cdc42およびRhoAに対してGEF活性を有する一方、Rac1にはGEF活性を持たないことが報告されている(非特許文献2)。

- [0166] hj03796DH/PHまたはproto-Dbl DH/PHに結合するRhoファミリー蛋白の特異性を確認するため、N末端側にGST-tagを付加した β -グルクロニダーゼ (Glucuronidase) (以下、GST-GUSと略称する)を陰性コントロールとして用いた。
- [0167] hj03796DH/PH発現ベクターまたはproto-Dbl DH/PH発現ベクターとRhoファミリー蛋白発現ベクターとを添加した無血清のDMEMとLipofectamine2000を添加したDMEMを混合し、室温で20分間インキュベーションした。得られた混合液を293EBNA細胞に添加した。293EBNA細胞は、遺伝子導入の前日に細胞数 6.0×10^4 /wellを24ウェルプレートへ播種し、37℃にて5%CO₂存在下で一晩培養した後に本実施例で用いた。遺伝子導入処理した細胞は37℃にて5%CO₂存在下で2日間インキュベーションした。培養終了後、PBS-EDTAにて細胞を洗浄し、プロテアーゼインヒビターカクテル (protease inhibitor cocktail、SIGMA社製) 1%を含む溶解バッファー (組成は実施例2を参照)にて細胞を溶解して細胞溶解液を調製した。
- [0168] 各細胞溶解液について、hj03796DH/PHまたはproto-Dbl DH/PHとRhoファミリー蛋白との結合をプルダウン法により検出した。各細胞溶解液300 μ L、溶解バッファーにけん濁した20 μ Lのグルタチオンセファロース4B (Glutathione sepharose 4B) および溶解バッファー100 μ Lを混合した。各サンプルは、MgCl₂およびジチオスレイトール (DTT) がそれぞれ最終濃度1mMとなるように調製した。回転盤にて回転させながら4℃で1時間反応させた後に、1mLの冷却した溶解バッファー (MgCl₂の最終濃度は1mM)を用いて遠心処理 (1,000rpmで4℃にて15秒間)により3回洗浄した。洗浄後、上清を除去したGlutathione sepharose 4Bに、溶解バッファーと等量のSDS-PAGEサンプルバッファー (組成は実施例2を参照)とを混合した溶液を40 μ L添加してミキサーにて攪拌後、加熱処理 (100℃にて5分間)して電気泳動用サンプルを調製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ブロッティングバッファー (組成は実施例2を参照)に5分間以上浸して平衡化した泳動ゲルから、PVDF膜上に蛋白質をトランスファーした。ブロッティング終了後のPVDF膜は、TBS-T+BA (組成は実施例2を参照)に4℃で一晩浸してブロッキング

した。ブロッキング終了後に、PVDF膜をTBS-T(組成は実施例2を参照)にて洗浄した(10分以上の振とうを1回)。

- [0169] 抗FLAG M2モノクローナル抗体(SIGMA社製)をTBS-T+BAで1000倍希釈してPVDF膜に添加し、37℃で1時間以上保温した。その後、PVDF膜をTBS-Tにて3回洗浄し(1回の洗浄に付き10分以上の振とう)、TBS-T+BAで1000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体(Cell Signaling Technology社製)を添加して、37℃で1時間以上保温した。最終的に、PVDF膜をTBS-Tにて3回洗浄した後(1回の洗浄に付き10分以上の振とう)、ECLプラスウエスタンブロッティングディテクションシステム(Amersham Biosciences社製)により、抗FLAG抗体に反応する発現蛋白質を検出した。化学発光シグナルは検出装置にて可視化した。
- [0170] 抗FLAG抗体にて予想分子量にバンドが検出された場合、hj03796DH/PHまたはproto-Dbl DH/PHはRhoファミリー蛋白質と結合すると判定した。図2に示したように、hj03796DH/PHとRhoファミリー蛋白質(Rac1、RhoAまたはCdc42)とを共発現させた細胞から調製した試料ではそれぞれ約50KDaにhj03796DH/PHに相当するバンドが検出された(図2の上図、hj03796DH/PHのレーン1、2および3)。一方、proto-Dbl DH/PHとRhoAまたはCdc42とを共発現させた細胞から調製した試料では、proto-Dbl DH/PHに相当する約40KDa付近にバンドが検出された(図2の上図、proto-Dbl DH/PHのレーン2および3)が、proto-Dbl DH/PHとRac1とを共発現させた細胞から調製した試料ではかかるバンドは検出されなかった(図2の上図、proto-Dbl DH/PHのレーン1)。hj03796DH/PHおよびproto-Dbl DH/PHとGST-tag融合 β -グルクロニダーゼとを共発現させた細胞から調製した試料では、かかるバンドは検出されなかった(図2の上図、レーン4)。すなわち、hj03796DH/PHおよびproto-Dbl DH/PHは、GST-GUSとは結合しなかった、また、Rhoファミリー蛋白質遺伝子を発現させなかったときにはかかるバンドは認められなかった(レーン5)。各細胞におけるhj03796DH/PHおよびproto-Dbl DH/PHの発現量を細胞溶解液を用いて比較したところ、ほぼ同量であった(図2の下図)。
- [0171] これらから、hj03796DH/PHがCdc42、RhoAまたはRac1と結合することが判

明した。したがって、hj03796DH／PHを含むhj03796全長蛋白質は、これらRhoファミリー蛋白質と結合すると考えられ、さらにRho-GEFとしての機能を有する可能性がある。

[0172] 本実施例で用いたCdc42、RhoAまたはRac1をN末端GST-tag融合蛋白質として発現させるための各発現ベクターは以下のように構築した。

Cdc42、RhoAまたはRac1の発現ベクターはゲートウェイTMクローニングテクノロジー(Invitrogen社製)を用いて作製した。まず、Multiple Tissue cDNA Panels (Clontech社製)のスプリーンファーストストランドDNA(spleen first strand DNA)をテンプレートとして、pfu turboを用いて各Rhoファミリー蛋白質(Cdc42、RhoAおよびRac1)をコードする遺伝子を増幅した。増幅産物を、TOPO cloning systemを用いた反応にてpENTR／Dに挿入してエントリーベクターを作製した。増幅反応にはプライマーとして、Cdc42遺伝子に対してはCdc42-s1(配列番号13)およびCdc42-as1(配列番号14)、RhoA遺伝子に対してはRhoA-s1(配列番号15)およびRhoA-as1(配列番号16)、Rac1遺伝子に対してはRac1-s1(配列番号17)およびRac1-as1(配列番号18)を使用した。次に、構築したエントリーベクターについて、N末端GST-tag融合蛋白質発現ベクターであるpDEST27を用いてLRクロナーゼによる組換え反応よりGST融合Rhoファミリー蛋白質発現プラスミドを作製した。各遺伝子のコード領域の塩基配列が正しく挿入されていることをシーケンスを行って確認した。シーケンス反応はDYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Biosciences社製)を、泳動および解析はABI PRISM 377を用いて行なった。

実施例 4

[0173] (hj03796DH／PHによるCdc42の活性化促進)

hj03796DH／PHのRhoファミリー蛋白質に対するGEF活性を、実施例2で構築したhj03796DH／PH(C末端FLAG-tag融合蛋白質)発現ベクターを用いて、エフェクタープルダウン法により検討した。Rhoファミリー蛋白質として、Cdc42、RhoAおよびRac1を用いた。これらRhoファミリー蛋白質はいずれもN末端3×FLAG-tag融合蛋白質として発現させた。

- [0174] hj03796DH/PH(C末端FLAG-tag融合蛋白質)発現ベクターと上記いずれかのRhoファミリー蛋白質を発現させるための発現ベクターとを、24ウェルプレートに播種した293EBNA細胞に導入した。ベクターの細胞への導入は、Lipofectamine 2000を用いて行った。陰性コントロールとして、細胞に各ベクターを導入せずに、Lipofectamine 2000のみを添加したものを用いた。遺伝子導入1日後、プロテアーゼインヒビターカクテル(1/100濃度:SIGMA社製)を含む溶解バッファーで細胞を溶解して細胞溶解液を調製した。次いで、細胞溶解液をエフェクターベッド(UPSTATE社製)と4℃で1時間反応させた。エフェクターベッドとして、PAK-1またはRhotekinの、活性型Rhoファミリー蛋白質に結合するドメインにGST-tagを付加した蛋白質が結合しているグルタチオンアガロースを用いた。反応させたエフェクターベッドは、溶解バッファーで洗浄し、溶出液(トリス・SDS・βメルカプトエタノール処理液:株式会社第一化学社製)で溶出操作を行った。得られた溶出液は、SDS-PAGEによりウエスタンブロッティングに付し、その後、抗FLAG抗体を用いてFLAG-tag付加蛋白質の検出を実施した。溶解バッファーは次の組成からなる:25mM HEPES、pH7.5;150mM NaCl;10mM MgCl₂;1mM EDTA;2% グリセロール;1% Triton X-100。
- [0175] hj03796DH/PHがRhoファミリー蛋白質に対してGEF活性を有するならば、hj03796DH/PHによりRhoファミリー蛋白質は不活性型(GDP結合型)から活性型(GTP結合型)に移行する。エフェクターベッドとして使用したPAK-1は活性型Cdc42および活性型Rac1と結合することが知られている。また、Rhotekinは活性型RhoAと結合する。したがって、hj03796DH/PHがRhoファミリー蛋白質に対してGEF活性を有するならば、エフェクターベッドに結合するRhoファミリー蛋白質量が増加する。抗FLAG抗体により、hj03796DH/PHおよびRhoファミリー蛋白質を共発現させた細胞から得た試料が、Rhoファミリー蛋白質のみを発現させた細胞から得た試料よりもRhoファミリー蛋白質のバンドが濃く検出される場合、hj03796DH/PHはGEF活性を有すると判定した。
- [0176] 結果を図3-Aおよび図3-Bに示す。図3-Aは、各細胞溶解液に含まれるRhoファミリー蛋白質および/またはhj03796DH/PHの発現を抗FLAG抗体により検

出した結果を示す。各Rhoファミリー蛋白質(図中ではRhoと示す)の発現は、hj03796DH/PHと共発現させた細胞およびRhoファミリー蛋白質のみを発現させた細胞のいずれにおいても、ほぼ同等であった(図3-Aのレーン2、4、6、8、10および12において白矢頭で示す)。RhoAについては複数のバンドが確認された(図3-Aのレーン6および8)。これは、蛋白質分解酵素による影響であると考えた。また、hj03796DH/PH(図中ではGEFと示す)の発現は、hj03796DH/PHのみを発現させた細胞および各Rhoファミリー蛋白質と共発現させた細胞のいずれにおいても、ほぼ同等であった(図3-Aのレーン3、4、7、8、11および12において黒矢頭で示す)。

- [0177] 図3-Bは、上記各細胞溶解液を用いてエフェクタープルダウン法を実施した結果を示す。Cdc42とhj03796DH/PH(図中ではGEFと示す)を共発現させた細胞から得た試料(図3-Bのレーン4)において、Cdc42のみを発現させた細胞から得た試料(図3-Bのレーン2)と比較して、バンドが濃く検出された。すなわち、Cdc42とhj03796DH/PHを共発現させた細胞では、PAK-1に結合する活性型Cdc42が増加した。このことから、hj03796DH/PHは、Cdc42に対してGEF活性を有することが明らかになった。よって、hj03796DH/PHを含むhj03796全長蛋白質もCdc42に対してGEF活性を有すると考える。このように、hj03796は、Cdc42の活性化を促進する機能を有することが判明した。

産業上の利用可能性

- [0178] 本発明に係るポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質はRhoファミリー蛋白質と結合し、さらにRhoファミリー蛋白質の活性化を促進した。本蛋白質およびポリヌクレオチドの利用により、Rhoファミリー蛋白質が関与する情報伝達経路および細胞機能の解明とその調節、並びに本蛋白質またはポリヌクレオチドの異常に基づく疾患、例えば胃腫瘍の診断、防止および／または治療が可能になる。したがって、本発明は基礎科学分野から医薬開発分野まで広く寄与する有用な発明である。

配列表フリーテキスト

- [0179] 配列番号1:グアニンヌクレオチド交換因子としての機能を有する蛋白質(配列番号2)をコードするポリヌクレオチド。

配列番号1:(602):(1126)Dbl相同ドメインをコードする領域。

配列番号1:(1202):(1495)プレックストリン相同ドメインをコードする領域。

配列番号3:配列番号1の第581番目から第1675番目までのヌクレオチドからなる部分配列であって、Dbl相同ドメインおよびプレックストリン相同ドメインをコードする領域を含むポリヌクレオチドであり、ここで該ポリヌクレオチドは配列番号4に記載のアミノ酸配列をコードする。

配列番号5:5'末端にコザックコンセンサス配列とメチオニンに対応するコドンとを有し、それに続いて、配列番号1の第581番目から第1675番目までのヌクレオチドからなる部分配列であってDbl相同ドメインおよびプレックストリン相同ドメインをコードする領域を含む配列を有するポリヌクレオチドであり、ここで該ポリヌクレオチドは配列番号6に記載のアミノ酸配列をコードする。

配列番号5:(1):(4)コザックコンセンサス配列。

配列番号5:(5):(7)メチオニンに対応するコドン。

配列番号7:プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号8:プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号9:プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号10:プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号11:プライマー用にproto-Dblの配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号12:プライマー用にproto-Dblの配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号13:プライマー用にCdc42の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号14:プライマー用にCdc42の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号15:プライマー用にRhoAの配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号16:プライマー用にRhoAの配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号17:プライマー用にRac1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号18:プライマー用にRac1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号19:コザックコンセンサス配列とそれに続くメチオニンに対応するコドンを含む設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号20:Cdc42遺伝子。

配列番号21:Cdc42

配列番号22:RhoA遺伝子

配列番号23:RhoA

配列番号24:Rac1遺伝子

配列番号25:Rac1

配列番号26:proto-Dbl(配列番号27)をコードする遺伝子。

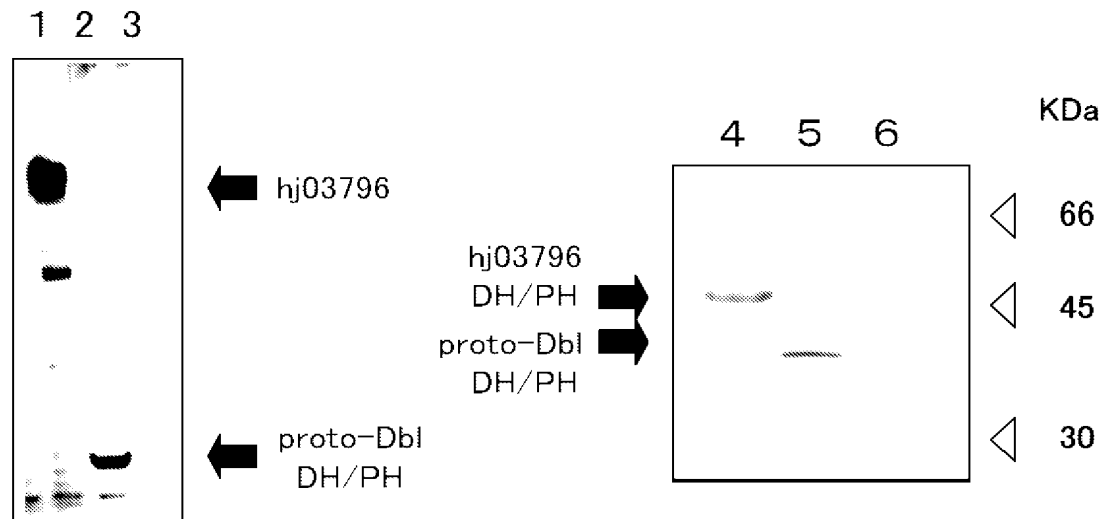
請求の範囲

- [1] 配列表の配列番号1に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド。
- [2] 配列表の配列番号3若しくは5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号4若しくは6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド。
- [3] 配列表の配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
- [4] 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドの塩基配列と少なくとも約70%の相同性を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
- [5] 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドの塩基配列において、1乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
- [6] 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであって、Cdc42の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
- [7] 請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- [8] 請求項7に記載の組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体。
- [9] 請求項7に記載の組換えベクターおよびCdc42をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体。
- [10] 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質。

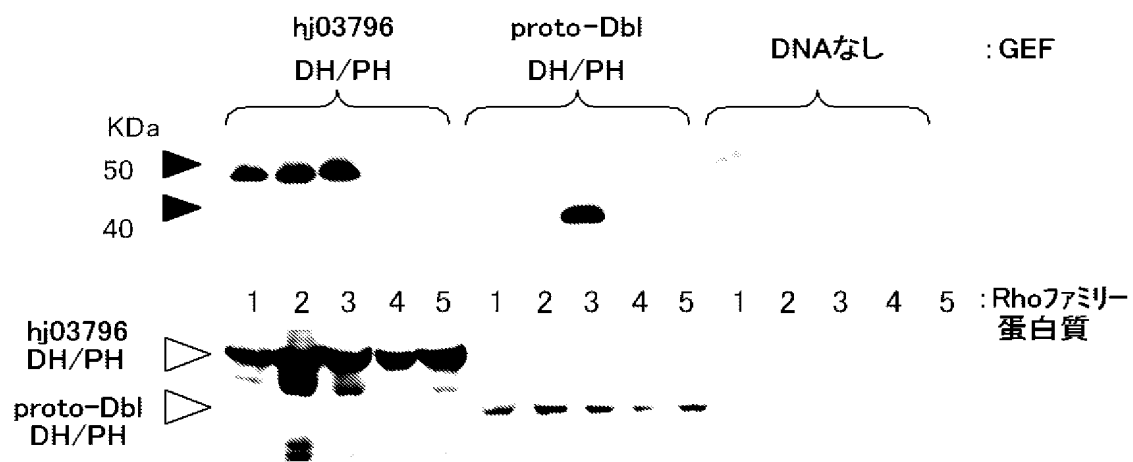
- [11] 配列表の配列番号4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質。
- [12] 請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質。
- [13] 請求項8または9に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質の製造方法。
- [14] 請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質を認識する抗体。
- [15] 請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質の機能および／または請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と該蛋白質および／または該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該機能および／または該発現の存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該蛋白質の機能および／または該ポリヌクレオチドの発現を阻害するか否かを判定することを特徴とする同定方法。
- [16] 蛋白質の機能が、Cdc42と結合する機能および／またはCdc42の活性化を促進する機能である請求項15に記載の同定方法。
- [17] 請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質の機能および／または請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質、請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項7に記載の組換えベクター、請求項8または9に記載の形質転換体および請求項14に記載の抗体のうち少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする同定方法。
- [18] 蛋白質の機能が、Cdc42と結合する機能および／またはCdc42の活性化を促進する機能である請求項17に記載の同定方法。
- [19] ヒト胃組織由来の被検組織がヒト胃腫瘍由来組織であるか否かを判定する方法であって、該被検組織における請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現量を測定することを特徴とする判定方法。
- [20] 被検組織における請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現量が、対照であるヒト正常胃由来組織における該ポリヌクレオチドの発現量の4.5倍以上である場合に、被検組織がヒト胃腫瘍由来組織であると判定することを特徴とする、請求項19に記載の判定方法。

- [21] 請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質の機能を阻害する化合物および／または請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を有効成分として含んでなる胃腫瘍の防止剤および／または治療剤。
- [22] 請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質の機能を阻害する化合物および／または請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を用いることを特徴とする胃腫瘍の防止方法および／または治療方法。
- [23] 請求項10から12のいずれか1項に記載の蛋白質、請求項1から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項7に記載の組換えベクター、請求項8または9に記載の形質転換体および請求項14に記載の抗体のうち少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット。

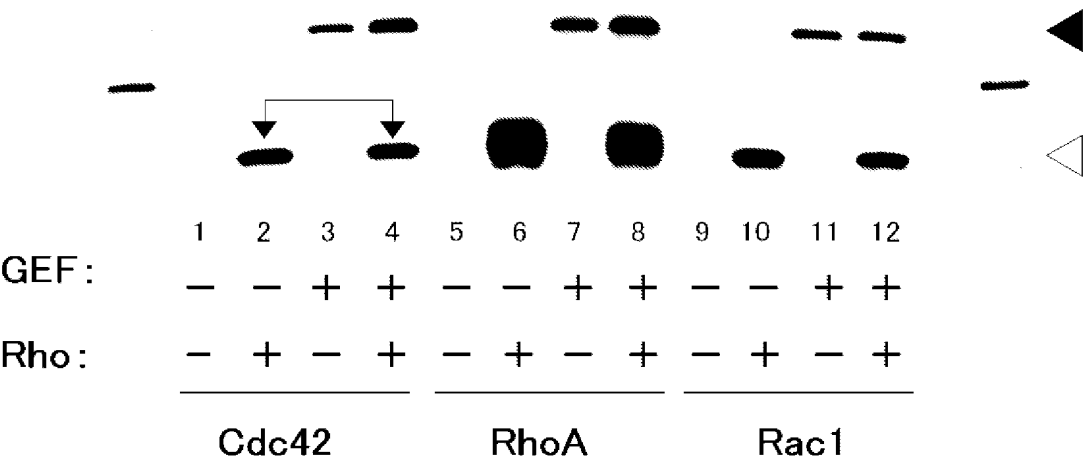
[図1]



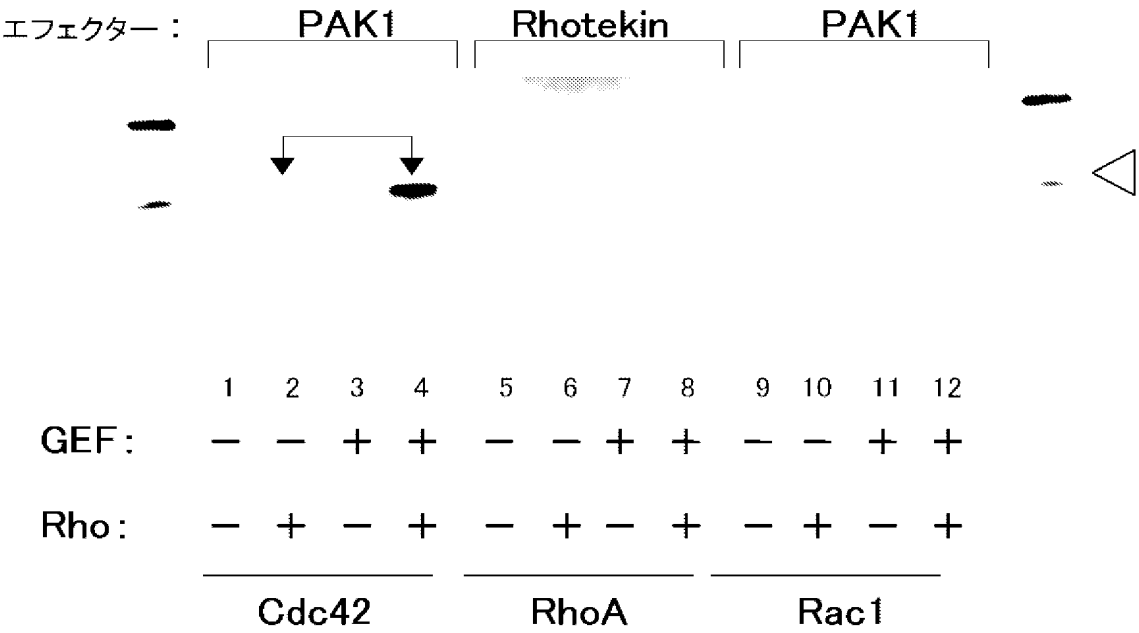
[図2]



[図3-A]



[図3-B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, A61K45/00, A61P1/00, 35/00, C07K14/705, 16/28,
C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15,
33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, A61K45/00, A61P1/00, 35/00, C07K14/705, 16/28,
C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15,
33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, BIOSIS (DIALOG),
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X/A | JP 2003-520565 A (Incyte Pharmacetricals, Inc.), 08 July, 2003 (08.07.03), Full text & WO 00/12711 A1 & EP 1117781 A | 14/1-13, 15-20,23 |
| A | Bi F. et al., Autoinhibition Mechanism of Proto-Dbl., Mol.Cell.Biol., 2001, 21(5), pages 1463 to 1474 | 1-20,23 |
| A | Hart M.J. et al., Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product., J.Biol.Chem., 1994, 269(1), pages 62 to 65 | 1-20,23 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April, 2005 (15.04.05)

Date of mailing of the international search report

10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005918

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 22 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☒ Claims Nos.: 21
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005918

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

<Subject of search>

Concerning the description in claim 21 "a compound inhibiting the function of a protein as claimed in any of claims 10 to 12 and/or a compound inhibiting the expression of a polynucleotide as claimed in any of claims 1 to 6", the scopes of the compounds having such properties cannot be specified, considering the common technical knowledge at the point of the application. Thus, claim 21 is extremely unclear and does not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6.

Such being the case, no meaningful search can be made on the invention according to claim 21.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/12, A61K45/00, A61P1/00, 35/00, C07K14/705, 16/28, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/12, A61K45/00, A61P1/00, 35/00, C07K14/705, 16/28, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2005年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2005年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2005年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---------------------------|
| X/A | JP 2003-520565 A(インサイト・ファーマスーティカルズ・インコーポレイテッド)2003.07.08 全文 & WO 00/12711 A1 & EP 1117781 A | 14 /1-13, 15-20, 23 |
| A | Bi F. et al., Autoinhibition Mechanism of Proto-Dbl. Mol. Cell. Biol., 2001, 21(5), p. 1463-1474 | 1-20, 23 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡邊 潤也

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3131

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | Hart M. J. et al., Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. J. Biol. Chem., 1994, 269(1), p. 62-65 | 1-20, 23 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲22 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲22は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲21 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページ参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

＜調査の対象について＞

請求の範囲 21 の「請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の機能を阻害する化合物および／または請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物」なる記載は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲 21 は著しく不明確であり、PCT6 条における明確性の要件を欠いている。

したがって、請求の範囲 21 に係る発明について有意義な調査をすることができない。